



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**PRODUÇÃO DE PROSTAGLANDINAS PELO ENDOMÉTRIO CANINO
AO LONGO DO CICLO ÉSTRICO E A SUA RELAÇÃO COM A TRANSCRIÇÃO DE
GENES DOS *TOLL-LIKE RECEPTORS***

SARA ALVES PAIVA DE BRITO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

ORIENTADOR

Doutora Luísa Maria Freire

Presidente:

Leal Mateus

Doutor Carlos Manuel Lopes Vieira Martins

CO-ORIENTADOR

Vogais:

Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

2011

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**PRODUÇÃO DE PROSTAGLANDINAS PELO ENDOMÉTRIO CANINO
AO LONGO DO CICLO ÉSTRICO E A SUA RELAÇÃO COM A TRANSCRIÇÃO DE
GENES DOS *TOLL-LIKE RECEPTORS***

SARA ALVES PAIVA DE BRITO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

ORIENTADOR

Doutora Luísa Maria Freire

Presidente:

Leal Mateus

Doutor Carlos Manuel Lopes Vieira Martins

CO-ORIENTADOR

Vogais:

Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

2011

LISBOA

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Luísa Mateus, pelos seus ensinamentos, por todo o apoio prestado na elaboração e desenvolvimento deste trabalho, pelo acompanhamento cuidadoso, e, em especial, pelo seu incansável sentido crítico na revisão minuciosa desta dissertação.

Ao meu co-orientador, Dr. Gonçalo Vicente, não só pelo excelente acompanhamento ao longo de todo o estágio e por todos os conhecimentos transmitidos ao longo do mesmo, mas também por todo o carinho e amizade que nos bons e maus momentos me reconfortaram e sem os quais estes meses tinham sido muito mais complicados.

À Dra. Elisabete Silva é à Sofia Henriques, pela imensa ajuda que me prestaram na elaboração deste trabalho, por todos os ensinamentos que me incutiram, por todo o apoio prestado nos momentos mais difíceis e sobretudo por tornarem a minha experiência na investigação motivante e até divertida. O meu sincero agradecimento pela paciência e por toda a amizade.

Aos Veterinários, auxiliares, demais estagiários e a todos os funcionários do HEFMV, pelo apoio e pela transmissão de conhecimentos que neste momento possuo, pela camaradagem e por todos os momentos de boa disposição os quais vou guardar para sempre no meu coração.

Ao Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), e às pessoas que o constituem, por me terem acolhido com carinho e amizade durante os meses de estágio e que contribuíram, de uma forma ou outra, para a execução prática deste trabalho.

À Liga Portuguesa dos Direitos do Animal (LPDA), a todo o corpo clínico em especial à Dra. Célia Antunes, Dra. Teresa Landeiro e Dr. Gonçalo Pereira, não só pela sua pronta disponibilidade e ajuda na colheita de material mas principalmente pela boa disposição que os caracterizam.

À Professora Conceição Peleteiro, responsável pelo Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária, por nos ter aberto amavelmente as portas do laboratório, permitindo o processamento do material biológico sem o qual o desenvolvimento deste trabalho não seria possível.

À D^a. Maria do Rosário, técnica de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária, pela sua eficiente e solícita colaboração durante o desenvolvimento deste estudo, nomeadamente na preparação, fixação e coloração de cortes histológicos.

Aos meus pais, irmãos e restante família por me tornarem a pessoa que hoje sou, por todo o apoio financeiro ao longo do meu percurso académico, pela ajuda prestada nos momentos mais complicados da minha vida e sobretudo por acreditarem em mim com amor e paciência incondicionais.

A todos os meus amigos, que, mesmo sem referir nomes, sabem o quanto são importantes para mim pela preciosa amizade, boa disposição e ajuda demonstrada ao longo destes anos.

Ao David, pela paciência sem fim, por me aturar quando nem mesmo eu me aturo, por saber sempre o que dizer nas alturas mais difíceis e pelo amor e carinho aos quais me habituou.

À Jessie, pela sua prestável colaboração como cobaia nos estudos dos primeiros anos de faculdade, pela companhia que me fez nas centenas de horas ao computador e pelo seu amor ilimitado.

A todos, o meu sincero Obrigada!

Resumo:

PRODUÇÃO DE PROSTAGLANDINAS PELO ENDOMÉTRIO CANINO AO LONGO DO CICLO ÉSTRICO E A SUA RELAÇÃO COM A TRANSCRIÇÃO DE GENES DOS *TOLL-LIKE RECEPTORS*

O endométrio canino constitui a primeira linha de defesa contra infecções bacterianas ascendentes, sendo os *toll-like receptors* (TLRs) elementos chave no reconhecimento de agentes patogénicos por parte do sistema imunitário inato. Um dos objectivos deste trabalho consistiu na avaliação da expressão de mRNA dos TLRs no endométrio da cadela ao longo do ciclo éstrico. Detectou-se a expressão de mRNA dos TLRs 1-7 e 9 por RT-PCR, o que demonstra a sua capacidade de reconhecimento de uma grande variedade de ligandos através da activação via TLRs. Verificou-se ainda que a transcrição dos TLRs 2 e 4 se encontra significativamente diminuída no início de diestro, o que pode justificar a maior susceptibilidade do útero à infecção por *E. coli* nesta fase. Pelo contrário, no final de diestro, a transcrição de genes destes receptores demonstrou estar bastante aumentada.

O outro objectivo consistiu na determinação da produção de PGE₂ e de PGF_{2α} por explantes do endométrio de diferentes fases do ciclo éstrico, na ausência e na presença de estímulos como o lipopolissacarídeo (LPS) e o ácido lipoteicóico (LTA). A estimulação com LPS e LTA levou a um aumento da produção de ambas as prostaglandinas em relação ao tecido não estimulado. No entanto, este aumento foi significativamente superior nos explantes de final de diestro, quando comparado com os de fase folicular, diestro e anestro. Estes resultados sugerem, em suma, a capacidade de activação dos TLRs 2 e 4 em modelos de cultura de explantes de endométrio de cadela, resultando na produção de mediadores capazes de regular a resposta inflamatória local.

Palavras-chave: cadela, piómetra, TLR, prostaglandinas, explantes de endométrio.

Abstract:

PROSTAGLANDINS PRODUCTION BY CANINE ENDOMETRIUM THROUGH THE OESTRUS CYCLE AND ITS RELATIONSHIP WITH *TOLL-LIKE RECEPTORS* GENES TRANSCRIPTION

The canine endometrium is the first line of defense against ascending bacterial infections and the toll-like receptors (TLRs) are key elements in pathogen recognition by innate immune system. The first aim of this study was to evaluate the mRNA expression of TLRs in the endometrium of the bitch throughout the oestrus cycle. Gene transcription of TLRs 1-7 and 9 was detected by RT-PCR, which demonstrates its ability to recognize a wide range of ligands through TLR activation. It was also found that gene transcription of TLRs 2 and 4 are downregulated in early diestrus, which might explain the higher susceptibility to uterine infection, induced by *Escherichia coli*, in this stage. On the other hand, in late diestrus the mRNA expression of these receptors has proven to be greatly increased.

The other objective was to assess the production of PGE₂ and PGF_{2α} by endometrial explants in different stages of the oestrus cycle, in the absence and presence of stimuli like lipopolysaccharide (LPS) and lipoteichoic acid (LTA). Stimulation with LPS and LTA led to an increased production of both prostaglandins compared with that observed in unstimulated tissues. However, this increase was significantly higher in explants from late diestrus, when compared with those in follicular phase, diestrus and anestrus. These results suggest, briefly, the activation of TLRs 2 and 4 in canine endometrial explants culture models, which result in the mediators production that may further regulate local inflammatory response.

Keywords: bitch, pyometra, TLR, prostaglandins, endometrial explants

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Índice Geral	xi
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xiv
Índice de Gráficos	xiv
Lista de Abreviaturas	xvi
I - Relatório de Estágio.....	1
II - Introdução e Objectivos	3
III - Revisão Bibliográfica.....	5
1. Complexo HQE – Piómetra.....	5
1.1. Descrição	5
1.2. Etiopatogenia	7
2. Imunidade inata: o papel dos <i>Toll-Like Receptors</i>	10
2.1. <i>Toll-like receptor 2</i> (TLR2)	12
2.1.1. O TLR2 e o ácido lipoteicóico (LTA)	13
2.2. <i>Toll-like receptor 4</i> (TLR4)	14
3. Prostaglandinas e o complexo HQE-P	16
3.1. Biossíntese	16
3.2. Receptores	17
3.2.1. Receptores EP e FP	18
3.3. Prostaglandina E ₂	19
3.3.1. Sintases	20
3.4. Prostaglandina F _{2α}	21
3.4.1. Sintases	21
IV – Materiais e métodos.....	23
1. Animais.....	23
1.1. Colheita de Amostras	23
1.2. Caracterização das Amostras	23
2. Estudo da transcrição de TLRs no endométrio da cadela	24
2.1. Amostras	24
2.2. Extracção de RNA e síntese de cDNA.....	24
2.3. Técnica de PCR convencional.....	25
3. Quantificação da expressão do mRNA dos TLRs 2 e 4 ao longo do ciclo éstrico da cadela, por PCR em Tempo Real	26
3.1. Amostras	26
3.2. Extracção de RNA e síntese de cDNA.....	26
3.3. PCR em Tempo Real.....	26

4. Cultura de Explantes de Endométrio.....	27
4.1. Amostras	27
4.2. Imunohistoquímica.....	27
4.3. Cultura de explantes de endométrio	28
4.3.1. Processamento dos explantes:	28
4.3.2. Cultura e estimulação dos explantes:	29
4.4. Doseamento de prostaglandinas	30
4.5. Extracção de RNA e síntese de cDNA.....	30
4.6. Quantificação relativa da expressão de mRNA para os genes de enzimas envolvidas na síntese de prostaglandinas e dos TLRs, por PCR em Tempo Real.....	31
5. Análise estatística.....	31
V – Resultados.....	32
1. Doseamento de progesterona.....	32
2. Estudo da transcrição de TLRs no endométrio da cadela	33
3. Quantificação da expressão do mRNA dos TLRs 2 e 4 ao longo do ciclo éstrico da cadela, por PCR em Tempo Real	36
4. Cultura de explantes de endométrio	38
4.1. Avaliação por imunohistoquímica da COX2.....	38
4.2. Doseamento de prostaglandinas	42
4.2.1. Dose-efeito	42
4.2.2. Produção de prostaglandinas em função da fase do ciclo éstrico	44
4.3. Quantificação relativa da expressão de mRNA para os genes de enzimas envolvidas na síntese de prostaglandinas e dos TLRs, por PCR em Tempo Real.....	49
4.3.1. Expressão do mRNA dos genes de enzimas envolvidas na síntese de prostaglandinas e dos TLRs 2 e 4 em endométrio não estimulado.....	50
4.3.2. Expressão do mRNA da PGES após estimulação dos explantes de endométrio	53
4.3.3. Expressão do mRNA da COX2 após estimulação dos explantes de endométrio	55
4.3.4. Expressão do mRNA da PGFS e dos TLRs 2 e 4 após estimulação dos explantes de endométrio	56
VI – Discussão	57
1. Expressão do mRNA dos TLRs no endométrio da cadela e sua quantificação por PCR em Tempo Real ao longo do ciclo éstrico	57
2. Cultura de Explantes de Endométrio.....	60
VII – Conclusões.....	65
VIII - Bibliografia	67

Índice de Figuras

Figura 1 – Exemplo de HQE em estadio I.....	6
Figura 2 – Exemplo de HQE em estadio IV (endometrite crónica/piómetra).	6
Figura 3 – Esquematização das diferentes vias de sinalização dos TLRs	11
Figura 4 – Sinalização via TLRs	12
Figura 5 – Sinalização via TLR4	14
Figura 6 – Biossíntese de prostanóides a partir do AA	17
Figura 7 – Cascata de sinalização via receptores EP e FP.....	18
Figura 8 – Exemplo ilustrativo de uma placa com incubação de explantes dependente da dose de LPS e de LTA.	29
Figura 9 - Exemplo ilustrativo de uma placa com incubação de explantes dependente do tempo.	29
Figura 10 – Expressão de mRNA do TLR1.....	33
Figura 11 – Expressão de mRNA do TLR2.....	33
Figura 12 – Expressão de mRNA do TLR3.....	33
Figura 13 – Expressão de mRNA do TLR4.....	34
Figura 14 – Expressão de mRNA do TLR5.....	34
Figura 15 – Expressão de mRNA do TLR6.....	34
Figura 16 – Expressão de mRNA do TLR7.....	35
Figura 17 – Expressão de mRNA do TLR9.....	35
Figura 18 – Expressão da COX2 por imunohistoquímica no endométrio e no ovário na fase de pró-estro.....	38
Figura 19 – Expressão da COX2 por imunohistoquímica no endométrio e no ovário na fase de estro (pós-ovulação).....	39
Figura 20 – Expressão da COX2 por imunohistoquímica no endométrio e no ovário no início de diestro (0-10 dias)	39
Figura 21 – Expressão da COX2 por imunohistoquímica no endométrio e no ovário em diestro (10-30 dias)	40
Figura 22 – Expressão da COX2 por imunohistoquímica no endométrio e no ovário na segunda metade de diestro (30-40 dias)	40
Figura 23 – Expressão da COX2 por imunohistoquímica no endométrio e no ovário no final de diestro	41
Figura 24 – Expressão da COX2 por imunohistoquímica no endométrio e no ovário na fase de anestro	41
Figura 25 – Produtos de PCR (PGES, COX2, TLR2) analisados por electroforese em gel de agarose.....	49
Figura 26 – Produtos de PCR (TLR4) analisados por electroforese em gel de agarose.	49
Figura 27 – Produtos de PCR (PGFS, RPL27) analisados por electroforese em gel de agarose.....	49

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a realização de PCR convencional.....	25
Tabela 2 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para PCR em Tempo Real.....	26
Tabela 3 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para PCR em Tempo Real.....	31
Tabela 4 – Marcação por imunohistoquímica da COX2 em cortes consecutivos de útero, ao longo do ciclo éstrico da cadela.....	42

Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Concentrações séricas de progesterona ao longo do ciclo éstrico da cadela... 32	32
Gráfico 2 – Valores de expressão de mRNA do TLR2 (Unidades Arbitrárias – UA) avaliados por PCR em Tempo Real.	36
Gráfico 3 – Valores de expressão de mRNA do TLR4 (Unidades Arbitrárias – UA) avaliados por PCR em Tempo Real.	37
Gráfico 4 – Percentagem de aumento de $\text{PGF}_{2\alpha}$, relativamente ao tecido não estimulado (C. neg.), em função da concentração de LPS.....	43
Gráfico 5 – Percentagem de aumento de PGE_2 , relativamente ao tecido não estimulado (C. neg.), em função da concentração de LPS.....	43
Gráfico 6 – Percentagem de aumento de $\text{PGF}_{2\alpha}$, relativamente ao tecido não estimulado (C. neg.), em função da concentração de LTA ($p<0,01$).....	43
Gráfico 7 – Percentagem de aumento de PGE_2 , relativamente ao tecido não estimulado (C. neg.), em função da concentração de LTA. ($p<0,05$).....	44
Gráficos 8 e 9 - Produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e de PGE_2 (pg/mg de tecido) em tecido não estimulado (CN) e estimulado com LPS e LTA.....	44
Gráfico 10 – Produção basal de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em tecido não estimulado em final de diestro e restantes fases (pg/mg de tecido).....	45
Gráfico 11 – Produção basal de PGE_2 em tecido não estimulado em final de diestro e restantes fases (pg/mg de tecido).....	45
Gráfico 12 – Produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ após estimulação dos explantes com LPS (pg/mg de tecido), ao longo do ciclo éstrico.	46
Gráfico 13 – Produção de PGE_2 após estimulação dos explantes com LPS (pg/mg de tecido), ao longo do ciclo éstrico.	46
Gráfico 14 – Produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ após estimulação dos explantes com LTA (pg/mg de tecido), ao longo do ciclo éstrico.	47
Gráfico 15 – Produção de PGE_2 após estimulação dos explantes com LTA (pg/mg de tecido), ao longo do ciclo éstrico.	47
Gráfico 16 – Razão entre os valores relativos do mRNA da PGES em tecido endometrial não estimulado ao longo de 6 horas de incubação e os do tecido não estimulado às 0 horas. Explantes de endométrio da cadela nº24, em meio de diestro (30-40dias).....	50
Gráfico 17 – Razão entre os valores relativos do mRNA da PGES em tecido endometrial não estimulado ao longo de 24 horas de incubação e os do tecido não estimulado às 0 horas. Explantes de endométrio da cadela nº26, em final de diestro.....	51
Gráfico 18 – Razão entre os valores relativos do mRNA da PGES em tecido endometrial não estimulado ao longo de 24 horas de incubação e os do tecido não estimulado às 0 horas. Explantes de endométrio da cadela nº27, em estro.....	51
Gráfico 19 – Razão entre os valores relativos do mRNA da COX2 em tecido endometrial não estimulado ao longo de 6 horas de incubação e os do tecido não estimulado às 0 horas. Explantes de endométrio da cadela nº24, em meio de diestro (30-40dias).....	51

Gráfico 20 – Razão entre os valores relativos do mRNA da COX2 em tecido endometrial não estimulado ao longo de 24 horas de incubação e os do tecido não estimulado às 0 horas. Explantes de endométrio da cadela nº25, em final de diestro com HQE.	52
Gráfico 21 – Razão entre os valores relativos do mRNA da COX2 em tecido endometrial não estimulado ao longo de 24 horas de incubação e os do tecido não estimulado às 0 horas. Explantes de endométrio da cadela nº26, em final de diestro.....	52
Gráfico 22 – Razão entre os valores relativos do mRNA da COX2 em tecido endometrial não estimulado ao longo de 24 horas de incubação e os do tecido não estimulado às 0 horas. Explantes de endométrio da cadela nº27, em estro.....	52
Gráfico 23 – Avaliação da variação relativa do mRNA da PGES (em %) verificado após estimulação, com LPS e LTA, em relação ao tecido não estimulado às 0 horas. Explantes de endométrio da cadela nº24, em meio de diestro (30-40dias).....	53
Gráfico 24 – Avaliação da variação relativa do mRNA da PGES (em %) verificado após estimulação, com LPS e LTA, em relação ao tecido não estimulado às 0 horas. Explantes de endométrio da cadela nº25, em final de diestro com HQE.....	53
Gráfico 25 – Avaliação da variação relativa do mRNA da PGES (em %) verificado após estimulação, com LPS e LTA, em relação ao tecido não estimulado às 0 horas. Explantes de endométrio da cadela nº26, em final de diestro.	54
Gráfico 26 – Avaliação da variação relativa do mRNA da PGES (em %) verificado após estimulação, com LPS e LTA, em relação ao tecido não estimulado às 0 horas. Explantes de endométrio da cadela nº27, em estro.	54
Gráfico 27 – Avaliação da variação relativa do mRNA da COX2 (em %) verificado após estimulação, com LPS e LTA, em relação ao tecido não estimulado às 0 horas. Explantes de endométrio da cadela nº24, em meio de diestro (30-40dias).....	55
Gráfico 28 – Avaliação da variação relativa do mRNA da COX2 (em %) verificado após estimulação, com LPS e LTA, em relação ao tecido não estimulado às 0 horas. Explantes de endométrio da cadela nº25, em final de diestro com HQE.....	55
Gráfico 29 – Avaliação da variação relativa do mRNA da COX2 (em %) verificado após estimulação, com LPS e LTA, em relação ao tecido não estimulado às 0 horas. Explantes de endométrio da cadela nº26, em final de diestro.	56
Gráfico 30 – Avaliação da variação relativa do mRNA da COX2 (em %) verificado após estimulação, com LPS e LTA, em relação ao tecido não estimulado às 0 horas. Explantes de endométrio da cadela nº27, em estro.	56

Índice de abreviaturas

% - Percentagem
µg – Microgramas
A – Anestro
AA - Ácido araquidónico
Bcl-2 – Proteína envolvida na apoptose
BSA – Bovine serum albumin
C. neg – Controlo negativo
Ca²⁺ – Ião cálcio
cAMP – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
CD14 – Cluster de diferenciação 14
CD36 – Cluster de diferenciação 36
cDNA – DNA complementar
CIISA – Centro Interdisciplinar de Investigação em Sanidade Animal
CN – Controlo negativo
CO₂ – Dióxido de carbono
COX – Ciclooxygenases
COX-1 – Ciclooxygenase 1
COX-2 – Ciclooxygenase 2
cPGES – PGES citosólica
dL – Decilitro
DMEM – *Dulbecco's modified Eagle's medium*
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DP1 – Receptor para a PGD₂ 1
DP2 – Receptor para a PGD₂ 2
E – Estro
E. coli - *Escherichia coli*
E₂ – Estradiol
ECC-1 – Linha pura de células endometriais
ECG – Electrocardiograma
EGF – Factor de crescimento epidérmico
EP – Erro padrão
EP1 – Receptor para a PGE₂ 1
EP2 – Receptor para a PGE₂ 2
EP3 – Receptor para a PGE₂ 3
EP4 – Receptor para a PGE₂ 4
FD – Final de diestro
FP – Receptor para a PGF_{2α}
FP_A – Variante A do receptor para a prostaglandina F_{2α}
FP_B – Variante B do receptor para a prostaglandina F_{2α}
GPCR – Receptor associado à proteína G
G_{αs} – Subunidade G_{αs} da proteína G
G_{αp} – Subunidade G_{αp} da proteína G
HBSS – *Hank's balanced salt solution*
HEFMV – Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária
HQE – Hiperplasia Quística do Endométrio
HQE-P – Complexo Hiperplasia Quística – Piómetra
ID – Início de diestro
IFN-α – Interferão α
IFN-β – Interferão β
IFN-γ – Interferão gamma
IGF-I – Factor de crescimento com actividade similar à insulina
IHQ – Imunohistoquímica
IL-1 – Interleucina 1
IL-1β – Interleucina 1β

IL-6 – Interleucina 6
 IP – Receptor para a PGI_2
 IP3 – Inositol trifosfato
 IRF – Factor de regulação do interferão
 IRF3 – Factor regulador do interferão 3
 IRF5 – Factor regulador do interferão 5
 IRF7 – Factor regulador do interferão 7
 JNK – c-Jun N-terminal cinase
 Kg – Quilogramas
 LBP – Proteína de ligação ao LPS
 LH – Hormona luteinizante
 LPDA – Liga Portuguesa dos Direitos do Animal
 LPS – Lipopolissacarídeo
 LTA – Ácido lipoteicoico
 MAL – MyD88-adaptor-like
 MAPK p38 – Proteína cinase mitogénio-activada p38
 MD – Meio de diestro
 mg – Miligramas
 min. – Minutos
 mL – Mililitros
 mM – Milimolar
 mm^3 – Milímetros cúbicos
 mPGES – PGES microssomal
 mPGES-1 – PGES microssomal 1
 mPGES-2 – PGES microssomal 2
 mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro
 MUC-1 – Mucina-1
 MyD88 – Factor de diferenciação mielóide 88
 NF- κ B – Factor nuclear-kappa B
 ng – Nanogramas
 NK – Células *natural-killer*
 nm – Nanómetros
 nM – nanomolar
 NO – Monóxido de azoto
 °C – Graus centígrados
 ON – *Overnight*
 OVH - Ovariohisterectomia
 p – Significância
 P_4 – Progesterona
 Pam_2CSK_4 – Lipoproteínas diacetiladas
 Pam_3CSK_4 – Lipoproteínas triacetiladas
 PAMPs – Padrões moleculares associados aos agentes patogénicos
 pb – pares de bases
 PBS – Tampão fosfato-salino
 PCR – Reacção em cadeia da polimerase
 PE – Pró-estro
 PG – Peptidoglicano
 PGD_2 - Prostaglandina D_2
 PGDS – Enzima sintase da prostaglandina D_2
 PGE_2 – Prostaglandina E_2
 PGES – Enzima sintase da prostaglandina E_2
 $\text{PGF}_{2\alpha}$ – Prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$
 PGFM – 15-keto-13,14-dihidro- $\text{PGF}_{2\alpha}$, metabolito activo
 PGFS – Enzima sintase da prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$
 PGG_2 – Prostaglandina G_2
 PGH_2 – Prostaglandina H_2
 PGI_2 – Prostaciclina

PGIS – Enzima sintase da prostaciclina
 PGs – Prostaglandinas
 PGT – Proteína transportadora de prostaglandinas
 PLA₂ – Enzima fosfolipase A₂
 PMNs – Polimorfonucleares neutrófilos
 PRR – Receptores de reconhecimento padrão
 RAW264.7 – Linha celular de macrófagos humanos
 RE – Reticulo endoplasmático
 RNA – Ácido ribonucleico
 rRNA – Ácido ribonucleico ribossomal
 RT-PCR - Reacção em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa
 RX – Raio-X
 seg. – Segundos
 SNC – Sistema nervoso central
 spp – Várias espécies
 SRD – Sem Raça Definida
 TAC – Tomografia axial computadorizada
 TAE – Tampão Tris-Acetato-EDTA
 TGF- α – Factor de crescimento transformador- α
 TIR – Domínio intracelular homólogo ao do Toll/receptor de IL-1
 TIRAP – ou MAL (*TIR-domain-containing adaptor protein*)
 TLR 1 – 13 – *Toll-like-receptor* 1 – 13
 TLRs – *Toll-like-receptors*
 TNF α – Factor de necrose tumoral- α
 TP – Receptor para o TXA₂
 TRAM – Molécula adaptadora relacionada com TRIF
 TRIF – Domínio adaptador contendo TIR indutor do interferão- β
 TXA₂ – Tromboxano A₂
 TXAS – Enzima sintase do tromboxano A₂
 U – Unidades
 UA – Unidades Arbitrárias
 W – Watts
 μ L – Microlitros

I - RELATÓRIO DE ESTÁGIO

O estágio curricular foi realizado no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária (HEFMV) tendo como orientadora a Professora Luísa Maria Freire Leal Mateus (Sector Reprodução e Obstetrícia) e como co-orientador o Dr. Gonçalo Eduardo Dias Vicente (Medicina Interna HEFMV). Este teve início a 28 de Setembro de 2009 tendo terminado dia 31 de Março, com uma duração total de 27 semanas. Após o período de estágio seguiram-se 6 meses de trabalho laboratorial durante os quais desenvolvi o meu projecto de mestrado no Laboratório de Reprodução da FMV e ainda no CIISA (Centro Interdisciplinar de Investigação em Sanidade Animal).

Durante o período de estágio no Hospital Escolar fiz rotação pelos serviços de Medicina e Internamento (19 semanas), Cirurgia (4 semanas) e Imagiologia (3 semanas). Para além destes serviços, uma vez por semana (normalmente à 4ª feira) o dia era dedicado à colheita de amostras de endométrio de cadelas submetidas a OVH na LPDA (Liga Portuguesa dos Direitos do Animal) em Carcavelos e ainda ao seguimento de casos da área de Reprodução.

Nos meses que passei no serviço de Medicina Interna e Internamento foi-me possível consolidar muitos dos conhecimentos adquiridos ao longo do curso e ainda ganhar competências novas na área dos animais de companhia. Era realizada a recepção do paciente com uma breve anamnese, o exame físico completo após o qual o médico responsável pela consulta discutia possíveis diagnósticos diferenciais, métodos de diagnóstico e terapêutica adequada. Sempre que possível e com consentimento do Médico Veterinário responsável punha em prática procedimentos médicos comuns, tais como a recolha de sangue, cateterizações, administração de medicação entre outros. Sempre que necessário fazia a admissão dos animais para Internamento e elaborava em conjunto com o Médico Veterinário responsável o plano do mesmo.

No serviço de cirurgia foram realizadas diversas tarefas como a recepção do paciente, auxílio na indução anestésica e preparação do animal para cirurgia. No bloco operatório, o trabalho foi rotativo com os restantes estagiários e/ou alunos, tendo participado como anestesista, circulante e ainda ajudante de cirurgião. Neste serviço, foi-me possível praticar e observar diversas cirurgias, sobretudo castrações e ovariohisterectomias sempre sob supervisão do cirurgião responsável. Participei ainda num *workshop* de cirurgia no qual pude praticar para além das cirurgias já mencionadas, esplenectomia, cistotomia, gastropexia e ainda anastomoses intestinais sob a orientação da Dra. Ana Murta.

Ao passar pelo serviço de Imagiologia participei nos mais variados procedimentos envolvidos, desde o correcto posicionamento dos pacientes no RX à interpretação dos mesmos. Assisti e auxiliei ainda na realização de TACs, ecografias e ecocardiografias.

Para além destes serviços rotativos foi-me ainda possível adquirir conhecimentos na área de Dermatologia, Oftalmologia, Neurologia, Ortopedia, Cardiologia e ainda Oncologia, assistindo e participando sempre que possível nas consultas das referidas especialidades.

Adicionalmente, sob orientação do Dr. Gonçalo Vicente, foi possível assistir e participar activamente em palestras mensais com casos clínicos, realizadas por alguns estagiários do Hospital da FMV, abordando diversos temas sobre: Anemia, Exame Neurológico, Pancreatite Felina, Tumores Testiculares (do qual eu fui autora), Exame Dermatológico e Electrocardiograma.

Relativamente à área de Reprodução e Obstetrícia sempre que possível acompanhei a minha orientadora Prof.^a Luísa Mateus nas suas consultas. Assisti e pratiquei, sempre com o seu consentimento, a inúmeras ecografias associadas a diagnósticos de gestação e a confirmações de afecções reprodutivas como por exemplo hiperplasia benigna prostática e hiperplasia quística do endométrio. Assisti igualmente a recolhas de sémen em cão e inseminações artificiais em cadela.

Ao terminar o período de estágio dediquei-me exclusivamente à investigação, continuando a recolher amostras de endométrio na LPDA e ainda no serviço de Cirurgia do HEFMV. No laboratório de Reprodução e com o auxílio da minha orientadora aprendi a identificar facilmente as fases do ciclo éstrico em cadelas, a fazer doseamentos por ELISA e ainda a fazer cultura de tecidos. Trabalhei também no CIISA onde, com a colaboração da Doutora Elisabete Silva e da Sofia Henriques (Bolseira de Investigação), aprendi diversas técnicas de laboratório como imunohistoquímica, a extracção de proteína, PCR e PCR em Tempo Real. Todos estes conhecimentos adquiridos em laboratório tornaram possível o desenvolvimento deste trabalho.

II - INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

O complexo hiperplasia quística do endométrio (HQE) – piómetra é a afecção endometrial mais frequente na cadela. A etiopatogenia da HQE ainda não está completamente esclarecida, sabendo-se porém que é uma alteração hormono-dependente e que pode predispor ao desenvolvimento de piómetra (Dow, 1959a; Payan Carreira & Pires, 2005). A *Escherichia coli* é a bactéria mais frequentemente isolada em casos de piómetra estando associada a sinais sistémicos mais exuberantes, que podem comprometer a sobrevivência da cadela (Dhaliwal, Wray & Noakes, 1998; Silva et al., 2010).

O endométrio constitui uma barreira fundamental na defesa uterina contra a infecção ascendente de agentes patogénicos do aparelho reprodutor feminino. A resposta uterina à infecção inclui a imunidade inata e a adquirida. Do mecanismo da imunidade inata fazem parte as barreiras naturais, a produção de citocinas, a activação do complemento e o sistema fagocitário. Esta baseia-se em receptores de reconhecimento padrão (PRR), codificados pelas linhas celulares germinativas do hospedeiro, dos quais fazem parte os *toll-like-receptors* (TLRs) (Janeway & Medzhitov, 2002; Khan et al., 2009).

A activação dos TLRs pelos seus agonistas resulta na activação de vários factores de transcrição como o factor nuclear-kappa B (NF- κ B), proteína cinase mitogénio-activada p-38 (MAPK p38) e c-Jun N-terminal cinase (JNK) levando à produção de citocinas pró-inflamatórias como o factor de necrose tumoral- α (TNF α), a interleucina 1 (IL-1), a interleucina 6 (IL-6) e ainda o monóxido de azoto (NO) (Beutler, Hoebe, Du & Ulevitch, 2003; Akira, Uematsu & Takeuchi, 2006). Estas por sua vez vão desencadear uma resposta imunitária que culmina no aumento da transcrição dos genes da síntese de prostaglandinas, levando à produção e acumulação de PGF_{2 α} e de PGE₂ (Helliwell, Adams & Mitchell, 2004; Mosca et al., 2007).

Com vista a elucidar o envolvimento dos TLRs na predisposição para o desenvolvimento de piómetra em diestro, este trabalho teve como objectivos caracterizar no endométrio e ao longo do ciclo éstrico:

1. a expressão de mRNA dos TLRs 1-7 e 9;
2. a quantificação da expressão do mRNA dos TLRs 2 e 4;
3. a avaliação da produção de PGE₂ e de PGF_{2 α} por explantes de endométrio, na ausência ou na presença de estímulos como o lipopolissacarídeo (LPS) e o ácido lipoteicoico (LTA).

Este trabalho faz parte do projecto “Contribuição para o estudo da fisiopatologia do complexo hiperplasia quística do endométrio - piómetra na cadela”, subsidiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) - PTDC/CVT/66587/2006 e pelo CIISA/FMV 74 - Hiperplasia do endométrio, tendo parte sido submetida à 15ª Conferência anual da Sociedade Europeia de Reprodução dos Animais Domésticos (ESDAR), Antalya, Turquia, 15 – 17 Setembro 2011, com o seguinte título:

“Transcription of Toll-Like Receptors in the Canine Endometrium during the Oestrous Cycle”

E. Silva, S. Henriques, S. Brito, G. Ferreira-Dias, L. Lopes da Costa, L. Mateus

CIISA, Faculty of Veterinary Medicine, Lisbon, Portugal.

III - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Complexo HQE – Piómetra

1.1. Descrição

A Hiperplasia Quística do Endométrio é a alteração do aparelho reprodutor feminino mais observada em cadelas. Sendo uma afecção de etiologia complexa e ainda não completamente esclarecida, surge na maioria das vezes associada a piómetra pelo que é mais vulgarmente designada por Complexo Hiperplasia Quística – Piómetra (HQE-P) (Dow, 1959a; Payan Carreira & Pires, 2005). Este complexo surge com maior frequência em cadelas do que em gatas (Noakes, Dhaliwal & England, 2001). Existem vários factores de risco associados ao desenvolvimento do complexo HQE-P como a raça, a idade, número de partos e tratamento com estrogénios ou progestagénios (Niskanen & Thrusfield, 1998).

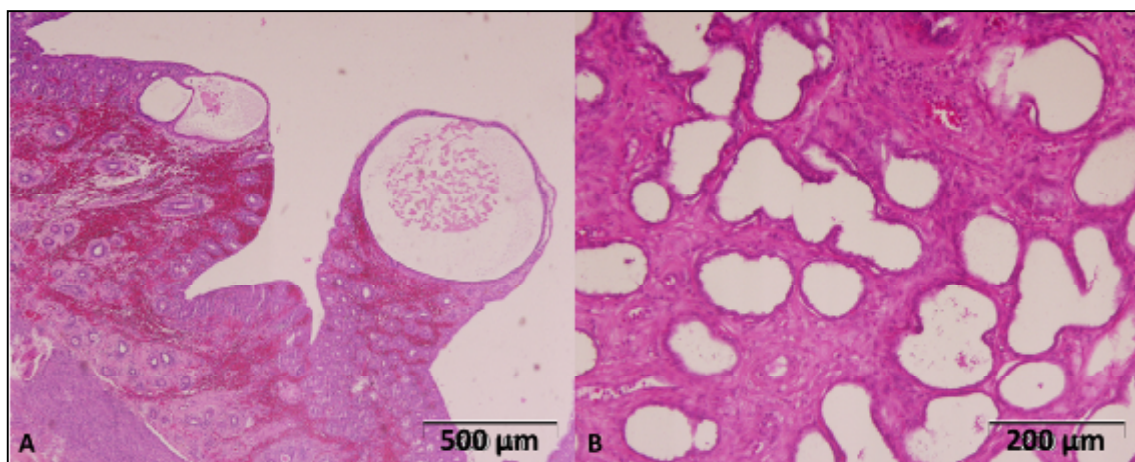
Sabe-se que a HQE é uma alteração hormono-dependente que se desenvolve após vários ciclos éstricos, não estando associado a sinais sistémicos de doença. É no entanto uma alteração que predispõe ao desenvolvimento de piómetra e que é causa de infertilidade (Dow, 1959b).

A piómetra é por definição a acumulação de pús no interior do lúmen uterino associada à persistência do corpo lúteo (Dow, 1959a). É uma doença de fêmeas sexualmente maduras e inteiras. Inicialmente causa alterações ligeiras pelo que é diagnosticada mais tardiamente com o agravar da situação (Smith, 2006). Nos EUA a prevalência de piómetra é baixa uma vez que a ovariectomia (OVH) electiva é prática comum (Kustritz, 2007). Estudos recentes demonstram uma incidência de 24% de piómetra em cadelas até aos 10 anos de idade. Entre as raças mais predispostas para o desenvolvimento desta afecção encontram-se o Golden Retriever, Schnauzer Miniatura, Irish Terrier, São Bernardo, Airedale Terrier, Cavalier King Charles Spaniel, Bernese Mountain Dog, Rottweiler e o Collie de Pêlo Longo. Cadelas SRD ou Wirehaired Dachshund têm risco diminuído (Egenvall et al., 2001; Hagman, 2004).

Em 1959, Dow propôs uma classificação para o complexo HQE-P na cadela em quatro estadios, numerados de I a IV, de acordo com alterações clínicas e anátomo-patológicas. O estadio I consiste na HQE não complicada, sem sinais clínicos evidentes, onde o endométrio se apresenta espessado com elevações quísticas irregulares. No estadio II já se verifica uma infiltração difusa de células inflamatórias, sobretudo no estroma superficial, e intensa produção de muco. Poderá estar associada a corrimento vulvar viscoso. O estadio III é caracterizado por HQE concomitante com endometrite aguda. Verifica-se assim reacção

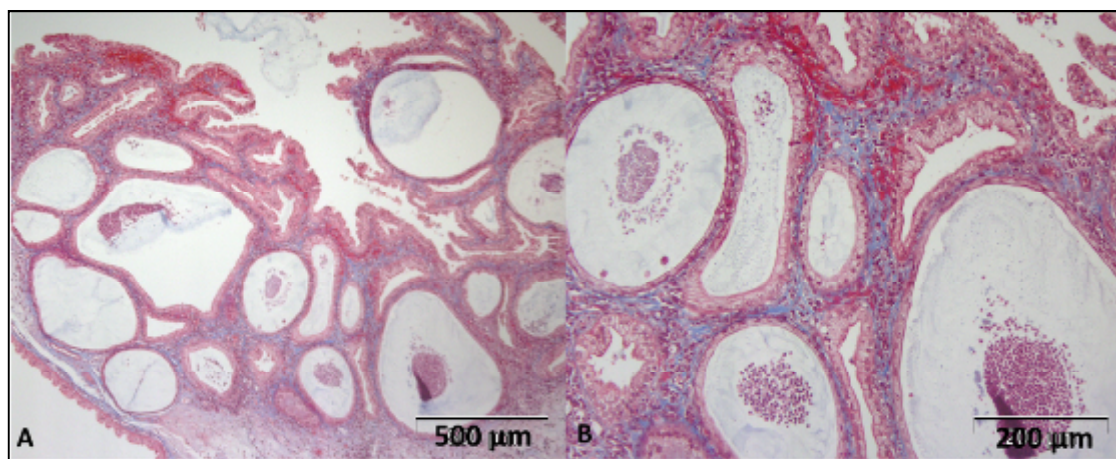
inflamatória aguda caracterizada por congestão, edema e infiltração generalizada de neutrófilos. O corrimento vulvar é abundante e de cor variável e observa-se distensão abdominal. Por último, o estadio IV caracteriza-se pelo agravar da HQE com endometrite crónica (piómetra) sendo que o cérvix se pode encontrar aberto ou fechado. No primeiro caso existe saída de conteúdo purulento, o endométrio encontra-se espessado, com um infiltrado difuso de células inflamatórias que se estende até ao miométrio. Este apresenta-se hipertrofiado e fibrótico (piómetra hiperplásica). Os sinais clínicos são moderados. No caso de piómetra fechada o útero está distendido por acumulação de conteúdo purulento. O endométrio pode revelar zonas de necrose e ulceração e à semelhança do miométrio encontra-se de espessura diminuída (piómetra atrófica). Os sinais clínicos são exuberantes devido à toxémia ou septicémia (Dow, 1959a).

Figura 1 – Exemplo de HQE em estadio I.



Legenda: A – pormenor de uma glândula quística nas glândulas apicais; B – glândulas basais dilatadas. Coloração com Hematoxilina & Eritrosina (H&E).

Figura 2 – Exemplo de HQE em estadio IV (endometrite crónica/piómetra).



Legenda: A e B – notar a intensa infiltração de neutrófilos. Coloração com Masson.

O diagnóstico diferencial entre cadelas com piómetra e aquelas com HQE em combinação com hidrómetra ou mucómetra pode não ser fácil. Alguns autores defendem mesmo que estas duas entidades (HQE e piómetra) devem ser compreendidas como únicas uma vez que as manifestações clínicas e alterações morfológicas são diferentes (Bosschere, Ducatelle, Vermeirsch, Broeck & Coryn, 2001). Este estudo revelou também que a HQE e a piómetra podem desenvolver-se independentemente já que, com o avançar da idade, todas as cadelas desenvolvem HQE mas só algumas evoluem para piómetra. Por norma, na piómetra os sinais clínicos associados à infecção bacteriana são de longe mais graves comparativamente com a HQE não complicada, na qual a única queixa é a diminuição de fertilidade e/ou prolificidade (Dow, 1959a). A piómetra fechada é uma emergência médica que requer intervenção rápida de forma a evitar a ocorrência de sepsis e morte subsequente da cadela (Smith, 2006).

1.2. Etiopatogenia

A etiopatogenia do complexo HQE-P envolve a progressão de eventos que começam com o desenvolvimento de HQE que vai estimular a resposta inflamatória local. Por sua vez, o endométrio hiperplásico e hipertrófico vai provocar o acumular de secreções que predispõem ao desenvolvimento bacteriano e, conseqüentemente, a piómetra (Schlafer & Gifford, 2008).

Durante o diestro a progesterona estimula a actividade secretora das glândulas endometriais, aumenta a proliferação das mesmas, diminui a contractilidade do miométrio, provoca o encerramento do cérvix e diminui a imunidade local (Hardy & Osborne, 1974). Todos estes efeitos são cumulativos o que explica a maior incidência em cadelas mais velhas. A estimulação estrogénica que precede o período de dominância da progesterona tem também um papel importante na patogenia da doença, embora sozinha não tenha qualquer influência como demonstrado já em trabalhos experimentais (Dow, 1959b). De facto a HQE ocorre mais facilmente quando a estimulação progestagénica é precedida pela administração de estrogénios. (Dow, 1959b). Os estrogénios promovem o crescimento, vascularização e edema endometrial, a dilatação e relaxamento do cérvix assim como a migração de neutrófilos (PMNs) para o lúmen uterino (Hardy & Osborne, 1974).

Apesar de tudo, estudos revelam que a concentração de progesterona e de estrogénios não se encontram anormalmente elevados no sangue periférico de cadelas com HQE-P, comparativamente a cadelas normais (Blendinger, Bostedt & Hoffmann, 1997; Chen, Wright & Lee, 2001).

Em 1997, De Cock et al. propôs que a HQE está associada a uma ausência do mecanismo de regulação negativa (*down-regulation*) dos receptores de estrogénio, induzida pela progesterona. Deste modo, o endométrio continua responsável aos estrogénios cuja produção se mantém durante a fase lútea (Onclin, Murphy & Verstegen, 2002). De facto, outros autores demonstraram que o número de receptores de estrogénio e progesterona se encontra aumentado em cadelas com HQE (De Bosschere, Ducatelle, Vermeirsch, Simoens & Coryn, 2002).

Em cadelas inteiras, a HQE tem sido induzida através da administração em prolongada de estrogénios e progestagénios em doses elevadas, através de biopsias uterinas, lesão intra-luminal e de substâncias irritantes como por exemplo fio de sutura de seda (Nomura, 1994; Noakes et al., 2001; De Bosschere, Ducatelle & Tshamala, 2002).

Por outro lado é possível induzir HQE através da inoculação de *Escherichia coli* durante o diestro (Noakes et al., 2001; De Bosschere, Ducatelle & Tshamala, 2003). Também se encontra descrito um modelo para a HQE através da utilização conjunta de benzoato de estradiol e acetato de megestrol (Chen et al., 2001; Chu, Lee, Moore & Wright, 2001).

Em 2006, Arora et al. conseguiram induzir experimentalmente o desenvolvimento de HQE-P através da inoculação de *E. coli*. Com este estudo puderam concluir que a inoculação intra-uterina é muito mais eficaz, em comparação com a intra-vaginal, para a indução de piómetra. Um estudo recente (Tsumagari et al., 2005) demonstrou através da inoculação intra-uterina de *E. coli* que o útero é mais susceptível à infecção entre o 11-20 e 21-30 após o pico de LH. Esta susceptibilidade da imunidade celular durante a primeira metade do diestro resulta provavelmente das concentrações elevadas de progesterona produzidas. A marcada falha de imunidade local permite a adesão da *E. coli*, que contamina o lúmen uterino durante o estro (Sugiura et al., 2004). A concentração elevada de progesterona possibilita também a adesão ao endométrio da *E. coli* devida à diminuição da expressão de mucina-1 (MUC-1). Esta diminuição verifica-se predominantemente ao décimo dia do diestro embora o gene para a transcrição da mesma seja detectado em todas as fases do ciclo éstrico (Leitner, Aurich, Galabova, Aurich & Walter, 2003; Ishiguro et al., 2007).

As bactérias que podem ser isoladas do conteúdo purulento uterino são a *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Klebsiella* spp., *Pasteurella* spp., *Pseudomonas* spp., e *Proteus* spp. Estas bactérias são também as que são isoladas da vagina de cadelas saudáveis (Baba, Hata, Fukata & Arakawa, 1983; Watts, Wright & Whithear, 1996). Destas destacam-se as Gram-negativas, particularmente a *E. coli* pela frequência com que é isolada e pela gravidade dos sinais clínicos aos quais está associada. (Fransson, Lagerstedt, Hellmen & Jonsson, 1997; Dhaliwal et al., 1998). As estirpes de *E. coli* isoladas

nos casos de piómetra são semelhantes às uropatogénicas uma vez que ambas apresentam os mesmos factores de virulência (Chen, Wright, Lee & Browning, 2003).

As bactérias Gram-negativas possuem na sua parede celular uma potente endotoxina, o lipopolissacarídeo (LPS), que se liberta na circulação sanguínea durante o crescimento ou destruição da bactéria. As endotoxinas têm muitas propriedades biológicas e activam muitos mediadores inflamatórios sendo responsáveis pela maioria dos sinais clínicos observados em cadelas com piómetra (Borresen, 1975; de Schepper, van der Stock & Capiou, 1987; Goodwin & Schaer, 1989; Hagman, Kindahl & Lagerstedt, 2006b). Dependendo da dose, a endotóxima pode ter vários efeitos biológicos. Em doses moderadas provoca leucocitose, febre, vômito, prostração e anorexia. À medida que a dose vai aumentando pode levar a hipotensão, choque e morte. De facto, estudos demonstram a relação entre as concentrações elevadas de endotoxinas plasmáticas e baixa taxa de sobrevivência (Goodwin & Schaer, 1989; Okano, Tagawa & Takase, 1998).

Outro factor que parece estar envolvido na génese da piómetra é o IGF-I (factor de crescimento com actividade similar à insulina), uma vez que em cadelas com piómetra se observa um aumento de receptores para o mesmo. O IGF-I tem um efeito mitogénico muito potente sobre o útero canino, tendo a sua expressão sido observada principalmente a nível do estroma do endométrio em casos de piómetras. (De Cock, Ducatelle, Tilmant & De Schepper, 2002).

Mais recentemente, Kida et al. (2010) sugeriram o envolvimento do TGF- α (factor de crescimento transformador- α) e do EGF (factor de crescimento epidérmico) na génese do complexo HQE-P. Ambos apresentam um papel importante na proliferação, diferenciação e regeneração dos tecidos epiteliais, sendo a sua expressão no útero regulada pelas hormonas esteróides. Um aumento da expressão de TGF- α no endométrio poderá contribuir para as alterações características de uma doença inflamatória crónica, tais como fibrose, proliferação excessiva de células do tecido conjuntivo e pólipos hiperplásicos, exacerbar o crescimento glandular (Kida et al., 2010) e induzir a transformação neoplásica do útero (Tamada et al., 2005). Pensa-se que o EGF esteja envolvido na involução das glândulas endometriais durante a fase média do diestro, em úteros normais. Em cadelas com HQE, a diminuição da sua expressão e a alteração da localização dos seus receptores no útero poderão resultar numa alterada involução das glândulas uterinas. As alterações observadas na expressão destes factores poderão dever-se à alteração da relação estrogénio/progesterona ou à infecção bacteriana (Kida et al., 2010).

2. Imunidade inata: o papel dos *Toll-Like Receptors*

A resposta uterina à infecção inclui a imunidade inata e a adquirida. O mecanismo da imunidade inata inclui respostas mais rápidas e primitivas em comparação com a adquirida, sendo que desta primeira fazem parte as barreiras naturais, a produção de citocinas, a activação do complemento e o sistema fagocitário (Khan et al., 2009).

A imunidade inata baseia-se em receptores de reconhecimento padrão (PRR), codificados pelas linhas celulares germinativas do hospedeiro, dos quais fazem parte os *toll-like-receptors* (TLRs). Estes reconhecem e interagem com padrões moleculares associados aos agentes patogénicos, os PAMPs, sintetizados pelos microrganismos (Janeway & Medzhitov, 2002; Horne, Stock & King, 2008; Khan et al., 2009). Encontram-se expressos em macrófagos, células dendríticas e, como mais recentemente demonstrado, em células epiteliais, células *natural-killer* (NK) e neutrófilos (PMNs) (Janeway & Medzhitov, 2002; Wira, Fahey, Sentman, Pioli & Shen, 2005; Khan et al., 2009). Em humanos e bovinos, a nível do endométrio os TLRs encontram-se expressos quer em células epiteliais quer em células do estroma (Herath et al., 2006; Davies et al., 2008; Horne et al., 2008).

Os TLRs são assim chamados devido à sua similaridade com *Toll*, um receptor identificado inicialmente na resposta imunitária a uma infecção fúngica na mosca da fruta, a *Drosophila melanogaste*, em 1996, por Lemaitre e colegas (Lemaitre, Nicolas, Michaut, Reichhart & Hoffmann, 1996; Khan et al., 2009).

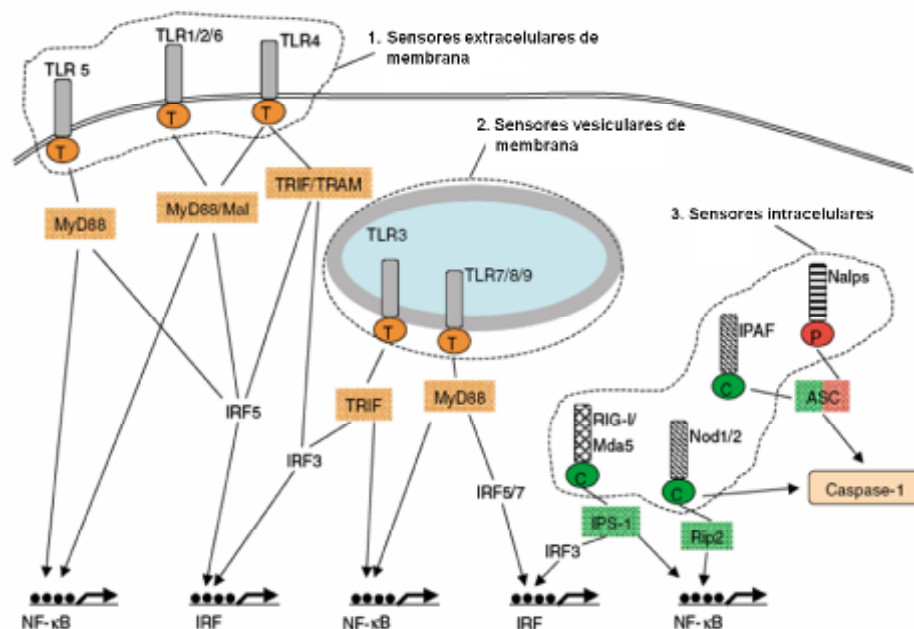
Até hoje foram identificados 10 TLRs em humanos e 12 em ratos sendo que os TLR 1-9 se encontram presentes nas duas espécies. O TLR 10 não se encontra funcional em ratos devido a um retrovírus e os TLR 11-13 foram perdidos no genoma humano (Kawai & Akira, 2010).

Os *toll-like-receptors* encontram-se divididos em dois subgrupos dependendo da sua localização celular e dos seus ligandos PAMPs. Um grupo é constituído pelos TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR11, que estão localizados à superfície das células e reconhecem uma grande variedade de componentes das membranas microbianas tais como lípidos, lipoproteínas e proteínas. Do segundo grupo fazem parte o TLR3, TLR7, TLR8 e o TLR9 que se encontram expressos exclusivamente em vesículas intracelulares como as do retículo endoplasmático (RE), endossomas, lisossomas e endolisossomas, onde reconhecem ácidos nucleicos microbianos (Kawai & Akira, 2010).

Vários estudos indicam que a cascata de sinalização dos TLRs é semelhante com excepção do TLR3 (Parker, Prince & Sabroe, 2007; McCoy & O'Neill, 2008). O domínio extracelular dos TLRs, rico em repetições de leucina, é responsável pelo reconhecimento dos PAMPs, sendo o domínio citoplasmático essencial para a sinalização intracelular. Uma vez

activados, os TLRs desencadeiam uma cascata de sinalização intracelular que culmina na síntese de citocinas pró-inflamatórias capazes de desencadear a resposta inflamatória local. Esta activação pode ocorrer através da activação de vários factores de transcrição como o NF- κ B (factor nuclear-kappa B), MAPK (Proteína cinase mitogénio-activada) p38 e JNK (c-Jun N-terminal cinase) e ainda membros da família IRF (factor de regulação do interferão). Estes activam outros genes levando à produção de citocinas inflamatórias como o TNF α (factor de necrose tumoral- α), a IL-1 (interleucina 1), IL-6 (interleucina 6) e ainda NO (monóxido de azoto) (Beutler et al., 2003). A activação final do NF- κ B pode ser desencadeada por um sinal proveniente de um TLR e a via de sinalização pode ser dependente ou independente da proteína adaptadora conhecida como MyD88 (factor de diferenciação mielóide 88). A via de sinalização MyD88-dependente é comum a todos os TLRs excepto ao TLR9. Se a via de activação for MyD88-independente, o sinal proveniente do TLR activa o NF- κ B por meio de outras duas moléculas adaptadoras, o TRIF e o TRAM. A MyD88 pode ainda associar-se a outra proteína, a MAL (ou TIRAP), para sinalizar a produção de NF- κ B (Doyle & O'Neill, 2006). A TRIF é uma proteína adaptadora que contém o domínio TIR (domínio homólogo ao receptor Toll/IL-1) e está associada à sinalização via TLR9. A via dependente de TRIF pode actuar também via outros factores de transcrição, como o IRF3, IRF5 e IRF7, todos eles culminando na activação dos genes que codificam IFN- α/β . A TRIF pode ainda associar-se com TRAM para desencadear a produção de NF- κ B e IRF3. Este caso ocorre quando há activação do TLR4. A proteína MAL é necessária à sinalização via TLR2 e TLR4 actuando ligada à MyD88 (Doyle & O'Neill, 2006; Bowie, 2007).

Figura 3 – Esquematização das diferentes vias de sinalização dos TLRs



Fonte: Adaptado de Werts, Girardin & Philpott, 2006

Dos 13 TLRs descritos em mamíferos o TLR2 e o TLR4 são os que estão melhor descritos no que respeita à resposta imunitária a infecções bacterianas.

2.1. Toll-like receptor 2 (TLR2)

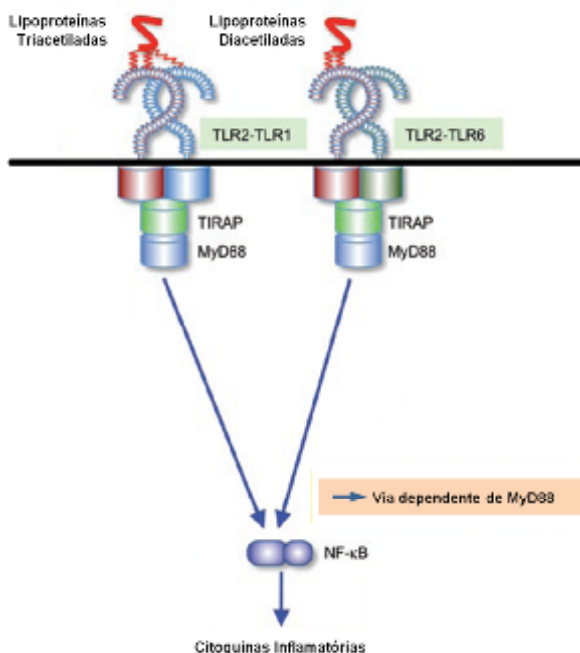
Vários agonistas têm sido descritos para o TLR2. Entre eles encontram-se vários componentes das bactérias Gram-positivas como o peptidoglicano (PG) (Means et al., 1999b), o ácido lipoteicóico (LTA) (Schwandner, Dziarski, Wesche, Rothe & Kirschning, 1999; Schroder et al., 2003), o lipoarabinomanano (Means et al., 1999a), as lipoproteínas (Takeuchi et al., 2002), o LPS de determinadas bactérias Gram-negativas (Kirschning, Wesche, Merrill Ayres & Rothe, 1998; Yang et al., 1998; Werts et al., 2001), as leveduras (Underhill et al., 1999), as espiroquetas e os fungos (Gantner, Simmons, Canavera, Akira & Underhill, 2003; Heine & Lien, 2003).

O primeiro agonista a ser identificado para o TLR2 foi o LPS (Kirschning et al., 1998; Yang et al., 1998) porém erradamente, uma vez que mais tarde se provou ser devido à contaminação de soluções comerciais de LPS com lipoproteínas das bactérias Gram-negativas (Lee, Lee & Tobias, 2002; Hellman, Tehan & Warren, 2003).

Actualmente reconhecem-se como agonistas para este receptor o ácido lipoteicóico (LTA) proveniente das bactérias Gram-positivas e as lipoproteínas/lipopéptidos provenientes de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Zahringer, Lindner, Inamura, Heine & Alexander, 2008).

Tal aparente falta de especificidade fez com que o TLR2 fosse considerado um receptor “promíscuo”. Esta promiscuidade tem sido atribuída à sua capacidade única de formar heterodímeros com os TLR1 e 6 (Ozinsky et al., 2000) e mais recentemente à sua associação com o CD36 na resposta à estimulação com lipoproteínas diacetiladas (Hoebe et al., 2005). Triantafyllou et al. (2006) demonstraram através dos seus estudos que efectivamente o TLR2 forma heterodímeros com o TLR1 e TLR6 e que estes existem mesmo antes da estimulação. Mostraram também que a capacidade do

Figura 4 – Sinalização via TLRs



Fonte: Adaptado de Kawai & Akira, 2010

LTA e de lipoproteínas diacetiladas (Pam₂CSK₄) para desenvolver resposta requer a presença dos CD14, CD36, TLR2 e TLR6. Pelo contrário as respostas às lipoproteínas triacetiladas (Pam₃CSK₄) requerem a presença do CD14, TLR2 e TLR6 mas não do CD36.

Em humanos, o mRNA do TLR2 encontra-se expresso no epitélio vaginal, ectocérvix, endocérvix (apenas em algumas zonas das glândulas apicais) assim como no epitélio dos cornos uterinos e endométrio (Fazeli, Bruce & Anumba, 2005). No entanto, a sua distribuição no aparelho reprodutor parece ser influenciada pela fase do ciclo (Hirata et al., 2007; Aflatoonian & Fazeli, 2008). Em bovinos este receptor encontra-se localizado igualmente no endométrio, quer nas células epiteliais quer nas células do estroma (Davies et al., 2008).

Num estudo recente, Silva et al. (2010) demonstraram que a transcrição do TLR2, assim como a do TLR4, se encontra aumentada em cadelas com piómetra.

2.1.1. O TLR2 e o ácido lipoteicoico (LTA)

Pensa-se que o LTA seja capaz de provocar a maioria das manifestações clínicas observadas durante as infecções bacterianas através da indução da secreção de mediadores pró-inflamatórios (Fischer, 1988). No entanto, as concentrações necessárias para provocar tais reacções são três a quatro vezes mais elevadas comparativamente com as necessárias de LPS (Zahringer et al., 2008).

Durante muitos anos a activação dos TLRs pelo LTA foi mal compreendida, levando à ideia errada de que era o TLR4 o responsável pelo seu reconhecimento. Tais estudos utilizavam diversas soluções comerciais de LTA (Bhakdi, Klonisch, Nuber & Fischer, 1991; Keller, Fischer, Keist & Bassetti, 1992; Schwandner et al., 1999) as quais para além de apresentarem alto grau de heterogeneidade composicional, estavam contaminadas com quantidades significativas de LPS (Gao, Xue, Zuvanich, Haghi & Morrison, 2001; Morath, Geyer, Spreitzer, Hermann & Hartung, 2002).

Mais tarde, demonstrou-se que preparações de células provenientes de *S. aureus* e *S. pneumoniae* mortas pelo calor induzem a transcrição do NF-κB via TLR2, com a participação do CD14 (Yoshimura et al., 1999). Tais dados eram consistentes com a observação de que ratos *knockout* para o TLR2 eram altamente susceptíveis à infecção por *S. aureus* quando comparados com ratos *knockout* para o TLR4 (Takeuchi, Hoshino & Akira, 2000).

Em 2003, através da utilização de preparações purificadas de LTA, chegou-se à conclusão que a via de reconhecimento deste agonista era em alguns aspectos semelhantes à via

TLR4 no reconhecimento do LPS. A activação da resposta pelo LTA é mediada pelo TLR2 mas dependente do CD14 e da LBP (Schroder et al.).

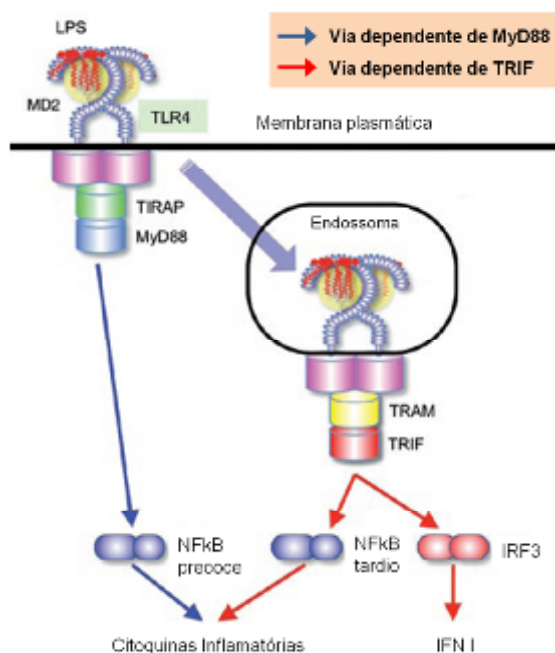
2.2. Toll-like receptor 4 (TLR4)

O TLR4 é o fundador da família dos TLRs, tendo sido identificado como o tão procurado receptor envolvido na resposta imunitária ao lipopolissacarídeo (LPS), componente da parede celular das bactérias Gram-negativas responsáveis pelo choque séptico (Akira et al., 2006).

No entanto, o LPS sozinho não é capaz de interagir com o TLR4. Este receptor forma inicialmente um complexo com o MD2 à superfície da célula que serve como principal componente de ligação com o LPS (Kim et al., 2007). Existem também outras proteínas capazes de se ligarem ao LPS. Destas fazem parte a proteína de ligação ao LPS (LBP), uma proteína plasmática solúvel, e o CD14. O CD14 possui a capacidade de, em conjunto com o LBP, se ligar ao LPS apresentando-o ao complexo TLR4-MD2 (Akashi-Takamura & Miyake, 2008).

Nos mamíferos, a sinalização através do TLR4 envolve a activação de uma ou mais proteínas adaptadoras. As mais relevantes neste processo são a MyD88 (factor de diferenciação mielóide 88), TIRAP (proteína adaptadora contendo um domínio TIR), TRAM (proteína adaptadora relacionada com TRIF) e TRIF (proteína adaptadora que contém o domínio TIR capaz de induzir IFN- β) (Kawai & Akira, 2006).

Figura 5 – Sinalização via TLR4



Fonte: adaptado de Kawai & Akira, 2010

Em humanos sabe-se que o mRNA do TLR4 se encontra expresso nas glândulas do endocérvix, glândulas endometriais e epitélio luminal dos cornos uterinos. Ao contrário do TLR2, este não se encontra expresso na vagina e no ectocérvix. Esta distribuição parece ter um papel importante na modulação da tolerância imunitária no aparelho reprodutor feminino e desempenha uma função única de defesa contra infecções ascendentes (Fazeli et al., 2005). Em bovinos a distribuição parece ser semelhante, sendo que o mRNA do TLR4 se encontra expresso igualmente em culturas puras de células endometriais (Davies et al., 2008).

Até à data não se conhecem estudos de localização deste receptor em cadelas. No entanto sabe-se que a sua transcrição está aumentada no endométrio de cadelas com piómetra (Silva et al., 2010).

3. Prostaglandinas e o complexo HQE-P

As prostaglandinas são substâncias orgânicas extremamente potentes que são produzidas numa grande variedade de tecidos e situações biológicas. Por terem sido descobertas e isoladas pela primeira vez no líquido seminal, como suposta secreção da próstata, foram assim denominadas, sendo o sufixo “glandinas” associado à glândula (Euler, 1935). Hoje sabe-se que as prostaglandinas estão presentes em todos os tecidos animais, quer vertebrados quer invertebrados, exercendo várias funções. Quimicamente, são parte de um grupo chamado eicosanóides (Rowley, Vogan, Taylor & Clare, 2005; Cha, Solnica-Krezel & DuBois, 2006).

As endotoxinas são potentes estimuladores da síntese de prostaglandinas (PGs). Estas desempenham funções muito relevantes quer fisiológica quer patologicamente. São ubiquitariamente produzidas e actuam de forma parácrina ou justácrina de modo a induzir diversos efeitos farmacológicos. Desta forma modulam diversos sistemas incluindo o sistema nervoso central (SNC), cardiovascular, gastrointestinal, genito-urinário, endócrino, respiratório e imunitário. Por outro lado, a sua síntese tem sido implicada numa grande variedade de afecções como por exemplo em neoplasias, doenças cardiovasculares e hipertensão (Hata & Breyer, 2004). São também importantes mediadores inflamatórios (Fredriksson, 1984; Horne et al., 2008).

3.1. Biossíntese

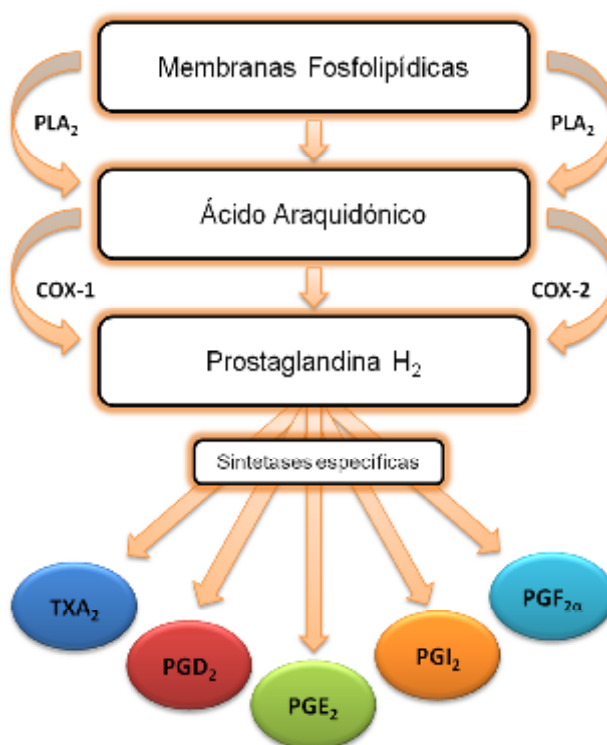
As prostaglandinas são derivados biologicamente activos do ácido araquidónico (AA), ou de outros ácidos gordos polinsaturados, que são libertados das membranas fosfolipídicas pela enzima fosfolipase A₂ (PLA₂). A transformação inicial do AA envolve oxigenação e ciclização num endoperóxido intermediário instável, a prostaglandina G₂ (PGG₂), por enzimas ciclooxigenases (COX) (Rocca & FitzGerald, 2002).

As COX coexistem em duas isoformas que diferem tanto em distribuição pelos tecidos como também na regulação da sua expressão. A COX-1 é considerada como constitutiva e encontra-se expressa em muitos tecidos enquanto a expressão da COX-2 é induzida, particularmente na resposta a citocinas inflamatórias ou a estímulos como o LPS. Assim sendo, as prostaglandinas produzidas via COX-1 são, de forma geral, responsáveis pela homeostase enquanto aquelas produzidas via COX-2 são responsáveis por efeitos inflamatórios (Hata & Breyer, 2004). As COX reduzem posteriormente a PGG₂ a PGH₂ através de uma peroxidação (Samuelsson et al., 1978).

A PGH₂ serve como substrato às enzimas sintases das prostaglandinas (PGES, PGFS, PGDS, PGIS e TXAS) que são responsáveis pela produção de cinco das principais

prostaglandinas bioactivas *in vivo*: A PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGD_2 , PGI_2 (prostaciclina) e ainda o TXA_2 (tromboxano A_2) (Hata & Breyer, 2004).

Figura 6 – Biossíntese de prostanóides a partir do AA



Fonte: Adaptado de Dannenberg, Lippman, Mann, Subbaramaiah & DuBois, 2005

3.2. Receptores

Os efeitos fisiológicos e patológicos das prostaglandinas são determinados através da sua ligação a determinados receptores. Após a sua biossíntese, os prostanóides são transportados para o exterior da célula por uma proteína transportadora de prostaglandinas (PGT), onde vão exercer as suas funções biológicas através da interacção com um receptor associado à proteína G (GPCR) (Sales & Jabbour, 2003a; b). Existem pelo menos nove tipos/subtipos de receptores, cada um codificado por genes diferentes (Narumiya, Sugimoto & Ushikubi, 1999). Quatro subtipos de receptores ligam-se à PGE_2 (EP1-EP4), dois à PGD_2 (DP1 e DP2) e os receptores FP, IP e TP apresentam afinidade para a $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGI_2 e TXA_2 respectivamente (Cha et al., 2006).

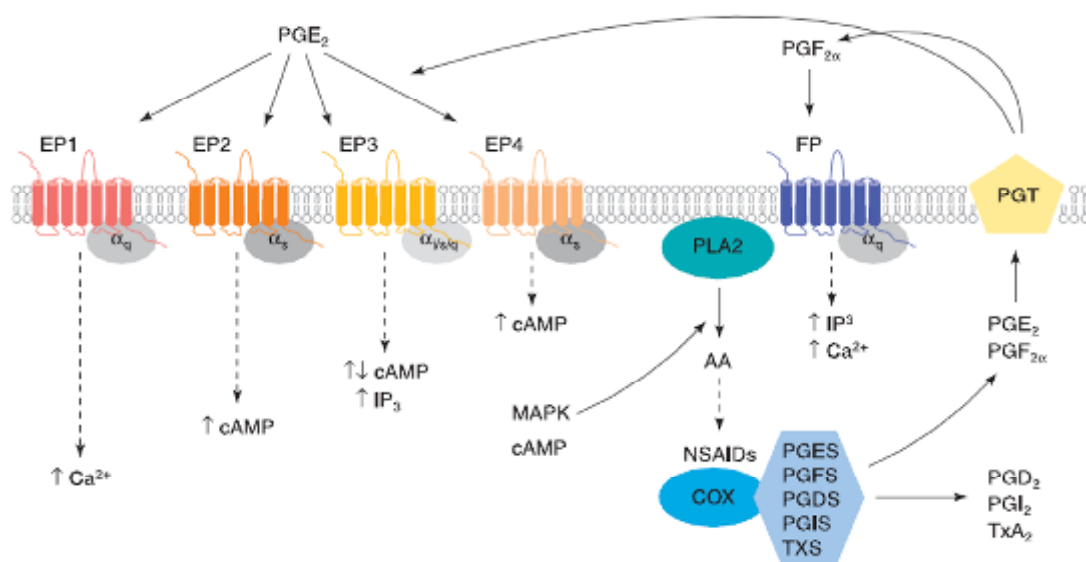
Devido à sua importância na biologia e patologia da reprodução, neste trabalho apenas serão discutidos os receptores EP e FP.

3.2.1. Receptores EP e FP

Os diversos efeitos associados à libertação de PGE_2 podem ser explicados em parte pela existência de quatro receptores, designados EP1, EP2, EP3 e EP4, e ainda pela heterogeneidade de associação entre os mesmos na cascata intracelular de transdução de sinal (Hata & Breyer, 2004). Dos quatro receptores, o EP3 e o EP4 são os que apresentam maior afinidade de ligação (Abramovitz et al., 2000).

Estes receptores utilizam vias intracelulares alternadas e por vezes opostas (Ashby, 1998). A interacção da PGE_2 com o receptor EP1 provoca a mobilização de cálcio intracelular e de IP_3 (inositol trifosfato) via G_{α_q} . A activação dos EP2 e 4 induz um aumento da acumulação do cAMP via G_{α_s} (Narumiya et al., 1999). Existem várias variantes para o receptor EP3, cada uma delas associada a uma via de sinalização diferente. Destas pode resultar um efeito positivo ou negativo no cAMP ou na mobilização de cálcio intracelular e IP_3 , dependendo da variante activada e do tipo de célula envolvida (Sugimoto et al., 1993; Narumiya et al., 1999). No útero, a estimulação dos receptores EP2 e EP4 induz um efeito relaxante enquanto a estimulação do EP1 tem um efeito contráctil. A activação do EP3 parece ter um efeito “inibitório” uma vez que a sua activação induz uma diminuição no cAMP (Narumiya & FitzGerald, 2001).

Figura 7 – Cascata de sinalização via receptores EP e FP



Fonte: Sales & Jabbour, 2003a

A $\text{PGF}_{2\alpha}$ apresenta afinidade para um único receptor, FP, originalmente clonado a partir de cDNA de tecidos humanos como o rim, o útero e a placenta (Abramovitz et al., 1994). Existem duas variantes para este receptor, denominadas FP_A e FP_B , identificadas pela primeira vez em ovelhas (Pierce et al., 1997; Fujino, Srinivasan & Regan, 2002).

O receptor FP é o que apresenta menor selectividade de todos os receptores de prostanóides, uma vez que possui capacidade de ligação com a $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGD_2 e PGE_2 , mesmo quando estas estão em baixas concentrações (Abramovitz et al., 2000).

Ambas as isoformas do FP estão associadas à $G_{\alpha p}$ levando à activação da sinalização pela fosfolipase C, seguida da activação da proteína cinase C com aumento de IP_3 e de Ca^{2+} intracelular. Tal aumento faz com que a activação deste receptor tenha um efeito contráctil à semelhança do EP1 (Narumiya et al., 1999; Narumiya & FitzGerald, 2001).

O papel funcional dos receptores de prostanóides tem sido avaliado com a utilização de ratos *knockout*, deficientes em cada um dos tipos de receptores. A maioria das descobertas mais relevantes foi derivada de ratos *knockout* para os receptores EP2 e FP, o que demonstrou a sua extrema importância na reprodução (Hizaki et al., 1999; Kennedy et al., 1999; Tilley et al., 1999; Narumiya & FitzGerald, 2001).

A ablação do gene que codifica o receptor EP2 resulta em taxas de ovulação reduzidas e na diminuição do tamanho da ninhada (Hizaki et al., 1999; Kennedy et al., 1999; Tilley et al., 1999), enquanto a ablação do gene que codifica o receptor FP resulta em aborto, embora seja possível salvar as crias através de uma cesariana electiva (Narumiya & FitzGerald, 2001). Nestes ratos existe uma falha na indução do receptor para a oxitocina e ainda na normal diminuição dos níveis de progesterona pré-parto. No entanto, realizando uma ovariectomia 24 horas antes do parto a expressão dos receptores para a oxitocina volta ao normal sendo possível um parto normal. Estes factos reforçam a importância da $\text{PGF}_{2\alpha}$ nos mecanismos do parto e ainda na regulação da expressão dos receptores para a oxitocina (Sugimoto, Segi, Tsuboi, Ichikawa & Narumiya, 1998).

3.3. Prostaglandina E_2

Esta é a prostaglandina mais abundante no corpo humano (Serhan & Levy, 2003). Dependendo do contexto, a PGE_2 exerce efeitos homeostáticos (Smith, 1989; Sugimoto, Narumiya & Ichikawa, 2000), inflamatórios (Davies, Bailey, Goldenberg & Ford-Hutchinson, 1984) ou pelo contrário anti-inflamatórios (Takayama et al., 2002).

A função exacta da PGE_2 no endométrio humano ainda não está completamente compreendida. No entanto, estudos anteriores sugerem um papel crucial na mitogénese e sobrevivência celular. Sabe-se ainda que esta prostaglandina é um importante mediador anti-apoptótico através da activação de diversas vias anti-apoptóticas como, por exemplo, o aumento da expressão do gene Bcl-2 (Jabbour & Sales, 2004; Wang & Dubois, 2006; Eisinger, Prescott, Jones & Stafforini, 2007; Banu, Lee, Speights, Starzinski-Powitz & Arosh, 2009).

3.3.1.Sintases

A conversão de PGH_2 em PGE_2 é da responsabilidade da PGES. Até à data foram identificadas três isoformas desta enzima sendo cada uma delas codificada por diferentes genes: a citosólica (cPGES) e as microssomais PGES-1 (mPGES-1) e PGES-2 (mPGES-2) (Jakobsson, Thoren, Morgenstern & Samuelsson, 1999; Murakami et al., 2000; Tanioka, Nakatani, Semmyo, Murakami & Kudo, 2000; Mancini et al., 2001; Tanikawa et al., 2002).

Considera-se que a cPGES é constitutivamente expressa numa grande variedade de tecidos, sendo resistente a estímulos pró-inflamatórios. No entanto, a nível cerebral, vários estudos indicam que a sua expressão pode ser induzida pelo LPS. A sua acção está associada à COX-1 na produção de PGE_2 , em resposta ao aumento de Ca^{2+} . Deste modo, é possível que na maioria dos tecidos a produção de PGE_2 via cPGES/COX-1 esteja envolvida na homeostase celular (Tanioka et al., 2000).

A mPGES-1 é regulada por estímulos pró-inflamatórios como a libertação de $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$ ou LPS, e a sua função está associada à COX-2 promovendo a síntese tardia de PGE_2 (Murakami et al., 2000). Apesar de a mPGES-1 ser altamente indutível, a sua expressão constitutiva tem sido relatada no aparelho genito-urinário (Guan et al., 2001).

A capacidade, demonstrada *in vivo* e *in vitro*, de estímulos pró-inflamatórios e LPS induzirem a expressão da mPGES-1 sugere que a sua regulação está intimamente ligada à resposta inflamatória (Stichtenoth et al., 2001; Lazarus et al., 2002; van Rees et al., 2003).

A isoforma mais recente, a mPGES-2, é ubiquitariamente expressa em diversos tecidos estando associada funcionalmente tanto à COX-1 como à COX-2. No entanto as suas funções fisiológicas e patológicas continuam pouco claras (Murakami et al., 2003).

Em bovinos está descrita a regulação da expressão da mPGES-1 e a sua associação com a COX-2 durante o ciclo éstrico (Arosh, Parent, Chapdelaine, Sirois & Fortier, 2002). Mais tarde, em 2005, estudos demonstraram a presença das três isoformas da PGES no endométrio bovino. No entanto a mPGES-1 continua a ser a maior responsável pelo aumento de PGE_2 *in vitro* (Parent & Fortier, 2005).

Mais recentemente, estudos em cadelas demonstram que a libertação de endotoxinas associada a casos de piómetra aumenta a transcrição da mPGES-1 assim como da COX-2, resultando em concentrações mais elevadas de PGE_2 (Silva, Leitao, Ferreira-Dias, Lopes da Costa & Mateus, 2009; Silva et al., 2010).

3.4. Prostaglandina $F_{2\alpha}$

A $PGF_{2\alpha}$ está envolvida em muitos processos fisiológicos incluindo o controlo da pressão intra-ocular, a vasoconstrição e a filtração glomerular (Weber, 1980; Crawford & Kaufman, 1987; Cracowski, Devillier, Durand, Stanke-Labesque & Bessard, 2001). Em humanos está associada a diversas afecções como a diabetes, a osteoporose e alterações menstruais (Poyser, 1995; Mezzetti, Cipollone & Cuccurullo, 2000; Soper et al., 2001). No entanto, é maioritariamente conhecida pelos seus efeitos no aparelho reprodutor feminino.

Na maioria dos mamíferos a produção uterina de $PGF_{2\alpha}$ está relacionada com a regulação do ciclo éstrico. Esta prostaglandina actua no corpo lúteo iniciando o processo de luteólise, finalizando a fase lútea ou gravidez (McCracken, Custer & Lamsa, 1999).

Na cadela, os factores responsáveis pelo início da luteólise são ainda desconhecidos. Sabe-se, no entanto, que a produção de $PGF_{2\alpha}$ pelo endométrio não tem o mesmo efeito luteolítico observado em ruminantes. Tal é facilmente demonstrado pelo facto de uma histerectomia não influenciar a duração da fase lútea (Okkens, Dieleman, Bevers & Willemsse, 1985).

Sabe-se que o endométrio normal sintetiza e liberta prostaglandinas, especialmente a $PGF_{2\alpha}$ (Heap, 1975). As células epiteliais excretam fundamentalmente $PGF_{2\alpha}$ enquanto as células do estroma produzem PGE_2 (Asselin, Goff, Bergeron & Fortier, 1996). Em cadelas, a produção de $PGF_{2\alpha}$ *in vitro*, através da cultura de explantes de endométrio, foi já observada (Luz, Bertan, Binelli & Lopes, 2006a).

A libertação sistémica de $PGF_{2\alpha}$ pode ser monitorizada através da mensuração plasmática do seu metabolito activo, o 15-keto-13,14-dihidro- $PGF_{2\alpha}$ (PGFM) (Granstrom & Kindahl, 1982). Na cadela, a sua mensuração permite a diferenciação entre a piómetra e a HQE (Hagman et al., 2006a).

3.4.1. Sintases

A biossíntese de $PGF_{2\alpha}$ pode ocorrer por três vias distintas, a partir da acção da PGH 9-,11-endoperóxido reductase sobre a PGH_2 , da acção da PGE 9-cetoreductase sobre a PGE_2 ou ainda através da conversão da PGD_2 pela PGD 11-cetoreductase. Após a actividade desta última enzima forma-se a 9 α -11 β - PGF_2 (Watanabe, 2002).

Em 1981, a PGD 11-cetoreductase foi denominada prostaglandina F sintase (PGFS) (Reingold, Kawasaki & Needleman). Esta existe em três isoformas: PGFS I, PGFS II e

ainda a prostamida/prostaglandina F sintase. As duas primeiras pertencem à superfamília das aldo-ceto redutases pelas suas características moleculares. No metabolismo do AA, as PGFS I e II catalisam duas reduções de PGH_2 a $\text{PGF}_{2\alpha}$ e de PGD_2 a $9\alpha\text{-}11\beta\text{-PGF}_2$ (Watanabe et al., 1986; Suzuki et al., 1999). A PGH_2 é sintetizada pela acção das COX sobre o AA enquanto a PGD_2 é sintetizada pela PGD sintase (PGDS) utilizando como substrato a PGH_2 . A prostamida/prostaglandina F sintase foi a última a ser descoberta e catalisa a redução de prostamida H_2 a prostamida $\text{F}_{2\alpha}$ e ainda a de PGH_2 a $\text{PGF}_{2\alpha}$. No entanto, a PGD_2 não serve de substrato a esta sintase (Moriuchi et al., 2008).

O endométrio de cadelas com piómetra apresenta níveis de transcrição da PGFS mais elevados bem como maior concentração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ comparativamente com o endométrio de cadelas saudáveis em diestro (Silva et al., 2009; Silva et al., 2010). Tal pode justificar as elevadas concentrações plasmáticas de PGFM observadas em casos de piómetra, consequência da síntese endometrial de prostaglandinas em resposta à estimulação pelas endotoxinas (Hagman et al., 2006a; Hagman et al., 2006b).

IV – MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Para este estudo foram utilizados cinquenta e quatro úteros de cadelas submetidas a ovariectomia (OVH). Estas apresentaram idades compreendidas entre os 6 meses e os 11 anos de idade (média de 3 anos). As OVHs foram realizadas no serviço de cirurgia do Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária e na Liga Portuguesa dos Direitos do Animal (LPDA).

1.1. Colheita de Amostras

Em cada animal, foi feita a colheita de uma zaragatoa para citologia vaginal e foi colhido aproximadamente 5mL de sangue para tubos com heparina sódica (Monovette®). Imediatamente após a OVH, foram colhidas amostras de endométrio, com auxílio de material cirúrgico estéril, e a porção cranial e caudal de cada corno uterino e ambos os ovários foram fixadas em formol tamponado (formaldeído a 4%, REF) até serem processadas histologicamente. O volume de formol utilizado foi aproximadamente 50 vezes o volume do fragmento a fixar (Aughey & Frye, 2001). Posteriormente, os fragmentos obtidos foram incluídos em parafina, utilizando um processador de tecidos LEICA TP 1020. Após a inclusão, foram realizados, por intermédio dum micrótomo, cortes de 4µm de espessura. Por fim, efectuou-se a coloração dos mesmos com Hematoxilina & Eritrosina (H&E). Este processamento foi feito no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa (FMV-UTL).

As amostras de sangue foram centrifugadas (10 min. a 3000g) e o plasma armazenado a -20°C em *ependorfs* até ao seu processamento.

1.2. Caracterização das Amostras

A caracterização da fase do ciclo éstrico foi efectuada através da observação macroscópica das estruturas ováricas, da citologia vaginal e do doseamento de progesterona.

A presença de hiperplasia quística do endométrio foi avaliada histologicamente e classificada segundo Dow C. (1959). O doseamento de progesterona foi efectuado sem extracção de amostra por radioimunoensaio (RIA), utilizando um *kit* comercial (Coat-A-Count, Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA, EUA). O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 3,2% para todas as amostras.

2. Estudo da transcrição de TLRs no endométrio da cadela

2.1. Amostras

Com o objectivo de estudar a expressão de mRNA dos TLR 1-7 e 9 no endométrio de cadela foram utilizadas amostras (n=11) representativas de cada uma das fases: início de diestro (n=3), meio e fim de diestro (n=3), anestro (n=2 com excepção dos TLRs 7 e 9 para os quais n=3), pró-estro (n=3) e estro (n=3). Todas as amostras de endométrio foram colhidas de modo já referido em 1.1, lavadas com solução salina RNase-free, congeladas em azoto líquido e armazenadas a -80°C até ao seu processamento.

2.2. Extracção de RNA e síntese de cDNA

Para a extracção do RNA total utilizaram-se aproximadamente 30 mg de tecido que foram processados utilizando um *kit* comercial, o RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. A digestão de DNA genómico foi efectuada com o *kit* RNase-free DNase Set (Promega, Madison, EUA). Após extracção, as amostras de RNA foram armazenadas a -80°C.

A concentração e pureza do RNA obtido foi determinada por espectrofotometria a 260 e 280nm (NanoDrop2000C Spectrophotometer, Thermo Scientific, Wilmington, EUA) e a qualidade do mesmo determinada através da visualização das bandas de rRNA 28S e 18S após electroforese em gel de agarose a 1,5%, na presença de brometo de etídio.

Para a síntese de cDNA utilizaram-se 500ng do RNA total obtido ao qual se adicionou 0,5µL de oligo(dT)15 *primers* (500ng/µL) (Promega) e 0,5µL de hexameros aleatórios (500ng/µL) (Promega). Esta mistura foi incubada durante 5 min. a 70°C e arrefecida de seguida em gelo para desnaturação do RNA. De seguida adicionaram-se os restantes componentes (4µL de M-MLV 5X Reaction Buffer (Promega), 1µL da mistura de dNTP's 10 mM (Promega), 25U de RNasin (40U/µL) (Promega) e 1µL de M-MLV RT (200U/µL) (Promega), num volume final de 20µL. A mistura foi então incubada a 37°C durante 60 min., 15min. a 42°C e finalmente a 94°C durante 5 min. Por último diluiu-se o cDNA (1:5) com água RNase-free. As amostras foram então armazenadas a -20°C.

2.3. Técnica de PCR convencional

A escolha dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) (tabela 1) foi efectuada inicialmente através do programa *Primer3 Software* sendo depois confirmados com *Primer Express® Software* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados para dois exões distintos de modo a evitar a amplificação de DNA genómico.

Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a realização de PCR convencional

Genes	Sequência de <i>Primers</i> (5'-3')	T (°C)	Tamanho do produto (pb)	Número de Acesso GeneBank
TLR1	FW - CAACAATTGGATATTAGCCAGAA RV - GATTGGTTTAGGAATGCTCCTT	55	192	NM_001146143.1
TLR2	FW - TCACTTGGGGAAACACCTCT RV - TCATACGGAGGGCCAGATAG	55	211	NM_001005264.2
TLR3	FW - GCGTGAATTTGACTGAACCTC RV - TCAAGTTCTTCACGCCTCAG	55	211	XM_540020.2
TLR4	FW - CAGCATTCCAGTTTGAAGCA RV - GGAGTTGTCCGGAAAGGAAT	56	174	NM_001002950.1
TLR5	FW - CTTCGTCTTCTCCCTGAACG RV - CTGAACGTCTGGTCTGGAT	56	249	XM_545722.2
TLR6	FW - CAAGTTCAACCAGGATTTGG RV - CCAAGCATTTCGAAGTTGTT	54	512	EU551147.1
TLR7	FW - TGGGCTCAAGTCCTTTCACT RV - CCACCAGACAAACCACACAG	56	337	NM_001048124.1
TLR9	FW - TGAGCTCCAAGCATCCTTTC RV - GATGCGGTTGGAGTACAAGG	56,5	303	NM_001002998.1

Para a amplificação destes genes procedeu-se a uma reacção de PCR utilizando 25pmol de cada *primer*, 0,1mM de cada dNTP, 1x PCR Buffer (Promega), 2mM MgCl₂ e 2,5U de enzima GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega), num volume final de 25 µL. Para cada reacção foram utilizados entre 1,5 a 2,5µL de cDNA. O GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) foi o aparelho utilizado.

A ausência de contaminação com DNA genómico foi verificada através de amplificação de amostras de cDNA negativas (sintetizadas sem adição da enzima transcriptase reversa – RT-). Foi igualmente adicionado um controlo negativo no qual em vez de cDNA se adicionou água.

Os produtos de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose a 2,5%, 1,5% ou 1% em TAE, na presença de brometo de etídeo. Após observação no aparelho Image Master VDS (Pharmacia Biotech) os produtos de PCR amplificados foram visualizados e o seu peso molecular determinado por comparação com as bandas do marcador (HyperLadder II – Biotline).

3. Quantificação da expressão do mRNA dos TLRs 2 e 4 ao longo do ciclo éstrico da cadela, por PCR em Tempo Real

3.1. Amostras

Devido à importância dos TLRs 2 e 4 na resposta imunitária ao nível do tracto reprodutivo, quantificou-se a sua transcrição de mRNA nas diferentes fases do ciclo éstrico da cadela através da realização de PCR em Tempo Real. Para tal foram utilizadas 24 amostras de endométrio as quais foram obtidas e processadas de modo já referido em 2.1.

3.2. Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração de RNA e visualização da sua pureza e qualidade foi efectuada de modo já referido em 2.2.

A síntese de cDNA foi efectuada pelo método atrás descrito (2.2).

3.3. PCR em Tempo Real

A escolha de oligonucleotídeos iniciadores foi efectuada da forma já referida em 2.3.

Tabela 2 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para PCR em Tempo Real

Genes	Sequência de <i>Primers</i> (5'-3')	Tamanho do produto (pb)	Número de Acesso GeneBank
TLR2	FW - CACTTCAATCCCCCGTTCAA RW - AATAATCCACTTGCCGGAATA	66	NM_001005264
TLR4	FW - CCTCTTGTCATTGGATACTAGCTT RW - TGCTGTTGTCCTTGTCCTTGA	105	NM_001002950
OAZ1	FW - CAGGTGGGCGAGGGAATAG RW - ATGTGTTTGGAGCCCGTGA	151	NM_001127234

Para a quantificação por PCR em Tempo Real foi utilizado o método da curva padrão para cada um dos genes alvo (TLR2 e TLR4). As curvas foram obtidas através da diluição seriada do cDNA plasmídico (Giulietti et al., 2001). Este consistiu em DNA plasmídico purificado específico para cada gene alvo. Resumidamente, os genes foram amplificados por RT-PCR qualitativo convencional utilizando os mesmos oligonucleotídeos iniciadores de PCR em Tempo Real, clonados em pGEM®-T Easy plasmídico e transformados em JM109 High Efficiency Competent Cells (Promega, Madison, EUA, ref.A1380). A concentração *stock* de cada cDNA plasmídico foi obtida por espectrofotometria e os plasmídeos padrão com número de cópias de interesse calculados de acordo com Applied Biosystems (AppliedBiosystems, 2003; Silva et al., 2008).

As reacções foram realizadas em duplicado em placas de 96 poços Prism® 7300 SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), usando ciclos de temperaturas universais: pré-incubação de 10 min. a 95°C, seguida de 45 ciclos a duas temperaturas (15seg. a 95 °C e 1min. a 60°C). Foram adquiridas curvas de dissociação (15seg. a 95°C, 30seg. a 60°C e 15seg. a 95°C) de modo a confirmar a amplificação apenas do produto esperado. As reacções foram efectuadas com 12,5µL Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido), 1µL de cDNA diluído 1:5 e 80nM de cada oligonucleotídeo iniciador, num volume total de 25µL por reacção. Após a análise das curvas de dissociação, os produtos de PCR foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 2,5%, de forma a confirmar o tamanho esperado dos mesmos.

Para cada gene, os resultados foram normalizados com o gene controlo endógeno OAZ1.

4. Cultura de Explantes de Endométrio

4.1. Amostras

Para este estudo foram utilizados úteros de 27 cadelas. O endométrio foi obtido de modo já referido anteriormente em 1.1 e utilizado imediatamente após a sua colheita. Para a análise imunohistoquímica foram utilizados cortes histológicos consecutivos, cujo processamento foi efectuado de modo descrito em 1.1.

4.2. Imunohistoquímica

A análise imunohistoquímica para a detecção da expressão de COX2 foi efectuada nos 27 úteros utilizados para as culturas de explantes de endométrio. Os cortes foram efectuados a partir do tecido embebido em parafina e montados em lâminas Superfrost® (Menzel Glaeser, D-38116 Braunschweig, Alemanha). Procedeu-se posteriormente à desparafinização do tecido em xilol, à reidratação gradual em álcoois e por fim à lavagem em água corrente durante 5 minutos.

A detecção imunohistoquímica foi efectuada pelo método da imunoperoxidase. Deste modo, a peroxidase endógena foi neutralizada através da incubação das lâminas em peróxido de hidrogénio a 0,3% em metanol durante 30 minutos. De seguida, procedeu-se à recuperação antigénica com incubação das lâminas em tampão citrato (10nM, pH=6) durante 5 minutos à temperatura ambiente seguida de incubação em microondas durante 15 minutos (700W). As lâminas foram então arrefecidas à temperatura ambiente durante 20 minutos, após os quais foram lavadas em tampão IHQ/0.3% Triton X pH 7.2 – 7.4 durante 5 minutos (tampão IHQ: 0.8mM Na₂HPO₄, 1.47mM KH₂PO₄, 2.68mM KCl, 137mM NaCl) e incubadas com solução

de bloqueio (Histostain® Plus Bulk Kit, Zymed 2ª geração, EUA) durante 1 hora, de forma a bloquear locais de ligação inespecíficos.

Os cortes foram então incubados durante 1 hora com o anticorpo primário monoclonal anti-ratinho para a COX2 (1:100, clone 33, BD Pharmingen, Erembodegem, Bélgica) diluído em tampão IHQ.

De seguida, as lâminas foram lavadas em tampão IHQ e incubadas durante 1 hora com anticorpo secundário policlonal biotinizado (Histostain® Plus Bulk Kit, Zymed 2ª geração, EUA). Após a lavagem das lâminas as enzimas avidina e biotina foram adicionadas. Depois de uma segunda lavagem de 10 minutos em tampão IHQ iniciou-se a reacção colorimétrica através do substrato DAB (Zytochem® Plus HRPDAB kit, Zytomed Systems, Berlim, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

Por último, lavaram-se as lâminas em água corrente durante 5 minutos após os quais foram coradas com hematoxilina e montadas com entelan (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Como controlos positivos foram incluídos no estudo cortes de ovário. Os controlos negativos foram incubados com o isótipo do anticorpo monoclonal Mab IgG1 correspondente (Dianova, Hamburgo, Alemanha) em igual concentração.

4.3. Cultura de explantes de endométrio

De forma a simular a resposta uterina à infecção bacteriana procedeu-se à estimulação de explantes de endométrio com LPS e LTA segundo o método de Bukulmez et al. (2008), com ligeiras modificações.

4.3.1. Processamento dos explantes:

Em cada útero expôs-se o endométrio com o auxílio de material cirúrgico estéril. De seguida cortaram-se pedaços de endométrio com cerca de 1-2 mm³ de espessura. Estes foram passados três vezes numa solução de lavagem constituída por HBSS (GIBCO®, Invitrogen Corporation, Nova Iorque, EUA) + 0,1% BSA (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA) + 1% Pen/Strep (GIBCO®, Invitrogen Corporation, Nova Iorque, EUA) + anfotericina 250µg/mL (GIBCO®, Invitrogen Corporation, Nova Iorque, EUA). Posteriormente 8 a 10 pedaços (aproximadamente 100mg) foram transferidos para uma placa de 6 poços (COSTAR®, Corning Incorporated, Nova Iorque, EUA) com 3 mL de meio de cultura constituído por DMEM/F12 (GIBCO®, Invitrogen Corporation, Nova Iorque, EUA) + 0,1% BSA + 1% Pen/Strep (GIBCO®, Invitrogen Corporation, Nova Iorque, EUA) + anfotericina 250µg/mL (GIBCO®, Invitrogen Corporation, Nova Iorque, EUA). Procedeu-se então a uma pré-incubação de 1 hora numa estufa de CO₂ (HERAcell® 150, Heraeus, EUA) a 37°C (95% ar e

5% CO₂) com vista à estabilização dos explantes. Todas as incubações foram feitas com agitação (IKA®-VIBRAX-VXR, Werke GMBH & CO.KG, Staufen Alemanha).

4.3.2. Cultura e estimulação dos explantes:

Após a pré-incubação, o meio de cultura foi renovado e procedeu-se à estimulação dos explantes com diferentes concentrações de LPS (n=27) (0,01µg/mL, 0,1µg/mL e 1µg/mL, Sigma, St. Louis, Missouri, EUA, 1mg/mL) e LTA (n=27) (1µg/mL e 10µg/mL, Sigma, St. Louis, Missouri, EUA, 5mg/mL) e em diferentes tempos de incubação (n=4) (2, 4, 6 e 24h). Foram incluídos no estudo controlos negativos (sem estimulação) com e sem tecido.

Figura 8 – Exemplo ilustrativo de uma placa com incubação de explantes dependente da dose de LPS e de LTA.

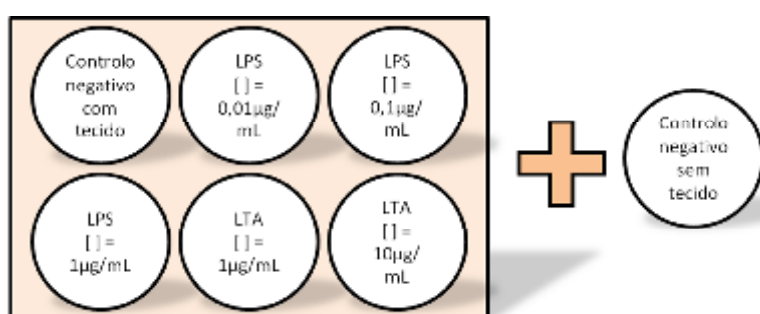
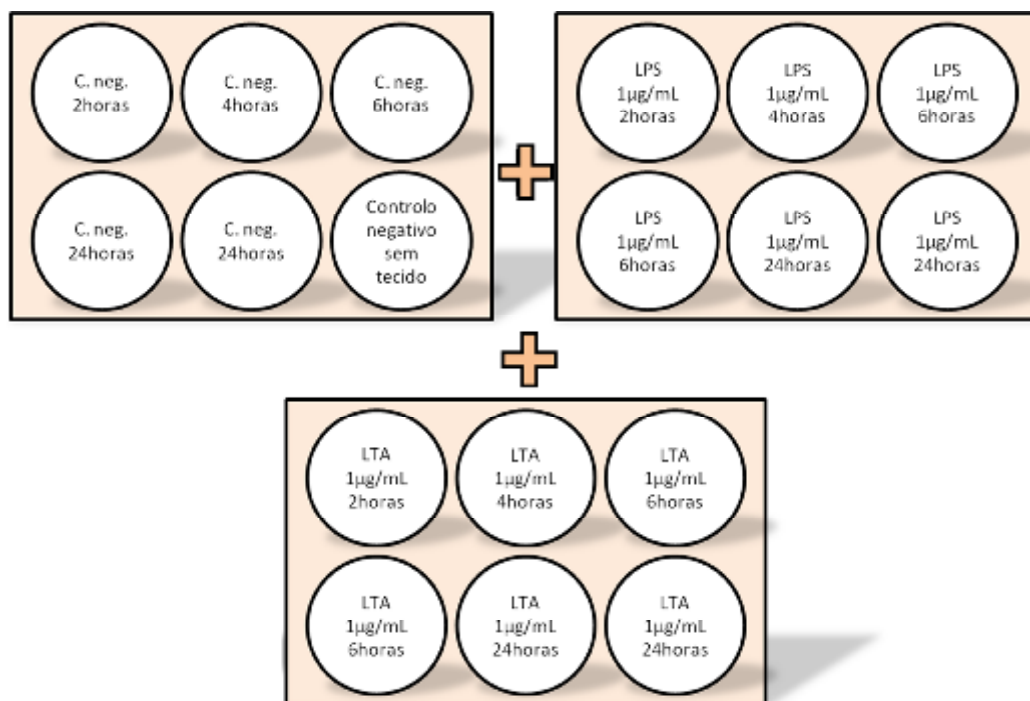


Figura 9 - Exemplo ilustrativo de uma placa com incubação de explantes dependente do tempo.



Legenda: C. neg – controlo negativo com tecido (tecido não estimulado). Na figura não se encontra ilustrado o controlo negativo com tecido 0horas.

No final de cada incubação, os sobrenadantes foram colhidos para *eppendorfs* para posterior doseamento de PGE₂ e PGF_{2α}. Após incubação os explantes foram armazenados em criotubos e congelados imediatamente em azoto líquido com vista à extracção de RNA. Todo o material foi armazenado a -80°C até ao seu processamento.

4.4. Doseamento de prostaglandinas

De modo a avaliar a resposta à estimulação com LPS e LTA procedeu-se ao doseamento de PGE₂ e PGF_{2α} nos sobrenadantes de cultura após 24 horas de incubação. As concentrações foram determinadas através da utilização de *kits* comerciais baseados num ensaio imunoenzimático (EIA) para a PGF_{2α} (Assay designs, Inc., Ann Arbor, EUA) e para a PGE₂ (R&D Systems Europe, Ltd., Abingdon, Reino Unido). Os coeficientes de variação intra-ensaios para a PGE₂ e para a PGF_{2α} foram de 3.5% e 2.3%, respectivamente. Todos os valores foram normalizados para mg de tecido e expressos em pg/mg de tecido.

4.5. Extracção de RNA e síntese de cDNA

Os explantes de endométrio de 4 cadelas foram utilizados para a extracção de RNA. Para a extracção do RNA total utilizaram-se aproximadamente 30 mg de tecido que foram processadas utilizando um *kit* comercial, o RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. A digestão de DNA genómico foi efectuada com RNase-free DNase Set (Promega, Madison, EUA).

A concentração e pureza do RNA obtido foi determinada por espectrofotometria a 260 e 280nm (NanoDrop2000C Spectrophotometer, Thermo Scientific, Wilmington, EUA). Após a extracção as amostras de RNA foram armazenadas a -80°C.

A síntese de cDNA foi efectuada através da utilização do *kit* comercial SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen Corporation, Nova Iorque, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Diluiu-se por fim o cDNA (1:5) com água RNase-free sendo este armazenado a -20°C até amplificação por PCR em Tempo Real.

4.6. Quantificação relativa da expressão de mRNA para os genes de enzimas envolvidas na síntese de prostaglandinas e dos TLRs, por PCR em Tempo Real

A escolha de oligonucleotídeos iniciadores foi efectuada da forma já referida em 2.3.

Tabela 3 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para PCR em Tempo Real

Genes	Sequência de <i>Primers</i> (5'-3')	Tamanho do produto (pb)	Número de Acesso GeneBank
COX2	FW - GTATGAGCACAGGATTTGACCAGTA RV - AATTCCGGTGTTGAGCAGTTTT	82	NM_001003354
PGES	FW - CAGAGCCCACCGGAATGA RV - GGAAGAAGACGAGGAAGTGCAT	116	NM_001122854
PGFS	FW - GGCCAAGAGCTTCAACGAGA RV - AGGCTGCTCAGAGTCTCCATG	93	NM_001012344
TLR2	FW - CACTTCAATCCCCCGTTCAA RW - AATAATCCACTTGCCGGGAATA	66	NM_001005264
TLR4	FW - CCTCTTGTCATTGGATACACTAGCTT RW - TGCTGTTGTCCTTGTTCCCTTGA	105	NM_001002950
RPL27	FW - ACAATCACCTCATGCCCACA RV - CTTGACCTTGGCCTCTCGTC	122	NM_001003102

A restante técnica foi efectuada pelo método da quantificação relativa (Silva et al., 2009) usando o gene RPL27 como controlo endógeno.

5. Análise estatística

Os dados foram analisados recorrendo ao programa *STATISTICA for Windows*, (Statistica 5.0, StatSoft Inc., Tulsa, EUA, 1995).

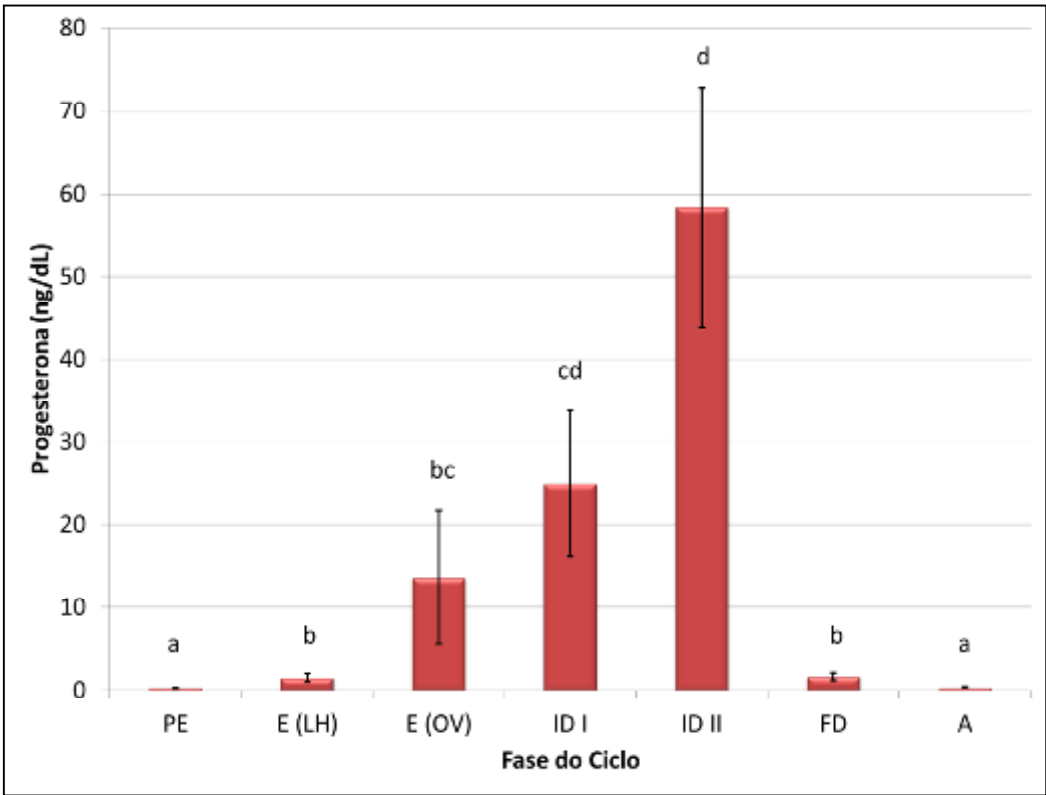
Na análise dos resultados de PGF_{2α} e PGE₂, após verificação da normalidade da distribuição da população, os dados foram transformados (log x +1) e, utilizado a análise de variância múltipla (MANOVA), analisados com dois efeitos fixos: efeito fase do ciclo éstrico (n = 4) e efeito estímulo (n = 3). Os efeitos significativos foram subsequentemente reavaliados *post-hoc* pelo teste das diferenças mínimas significativas (LSD). Todos os outros dados foram avaliados utilizando o teste Mann–Whitney U-test. O nível de significância escolhido foi de 5% (p<0,05).

V – RESULTADOS

1. Doseamento de progesterona

Os valores de progesterona utilizados para caracterizar a fase do ciclo das amostras de endométrio utilizadas encontram-se representados no Gráfico 1. Como esperado, as concentrações mais elevadas verificam-se no início de diestro especialmente entre os 10-30 dias. Após este período os valores começam a decrescer devido à regressão do corpo lúteo, até retornarem a valores basais no anestro.

Gráfico 1 – Concentrações séricas de progesterona ao longo do ciclo éstrico da cadela.

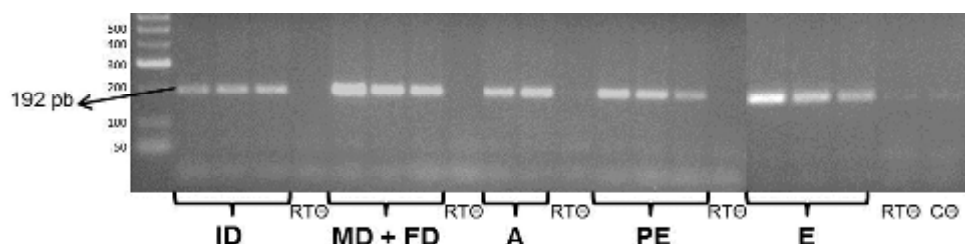


Legenda: PE – pró-estro; E (LH) – estro no pico de LH; E (OV) – estro na ovulação; ID I – início de diestro (0-10dias); ID II – diestro (10-30 dias); FD – final de diestro; A – anestro. Letras diferentes reflectem grupos com diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$, Mann–Whitney U-test).

2. Estudo da transcrição de TLRs no endométrio da cadela

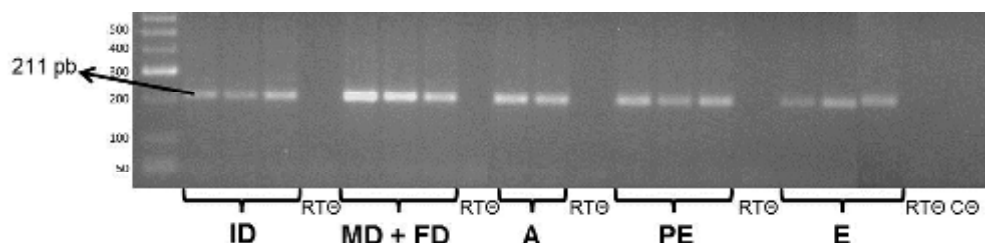
Após análise dos resultados de RT-PCR verificou-se que todas as amostras avaliadas das diferentes fases do ciclo éstrico foram positivas para a expressão de mRNA dos genes que codificam os TLRs 1-7 e 9. Todos os produtos amplificados tiveram a massa molecular esperado, não se observando amplificação nos controlos negativos (RT-) o que indica a ausência de contaminação com DNA genómico.

Figura 10 – Expressão de mRNA do TLR1



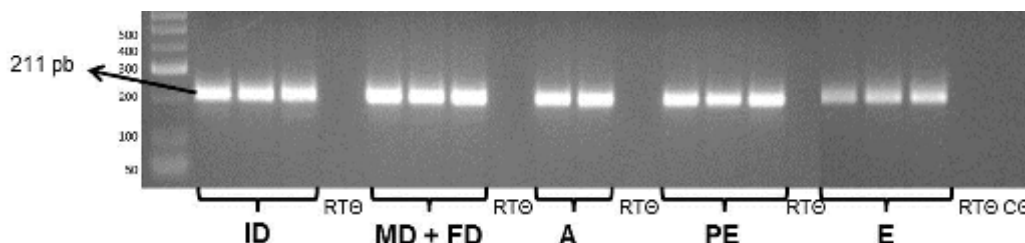
Legenda: ID – início de diestro; MD + FD – meio e fim de diestro; A – anestro; PE – pró-estro; E – estro; RT- – reacção sem adição da transcriptase reversa; CØ – Controlo negativo.

Figura 11 – Expressão de mRNA do TLR2



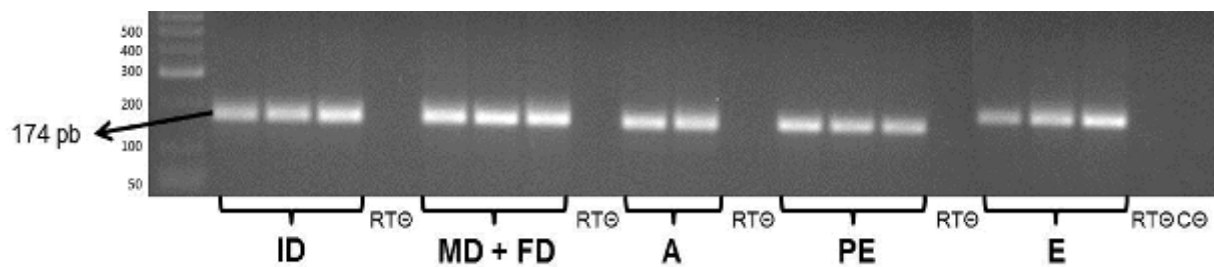
Legenda: ID – início de diestro; MD + FD – meio e fim de diestro; A – anestro; PE – pró-estro; E – estro; RT- – reacção sem adição da transcriptase reversa; CØ – Controlo negativo.

Figura 12 – Expressão de mRNA do TLR3



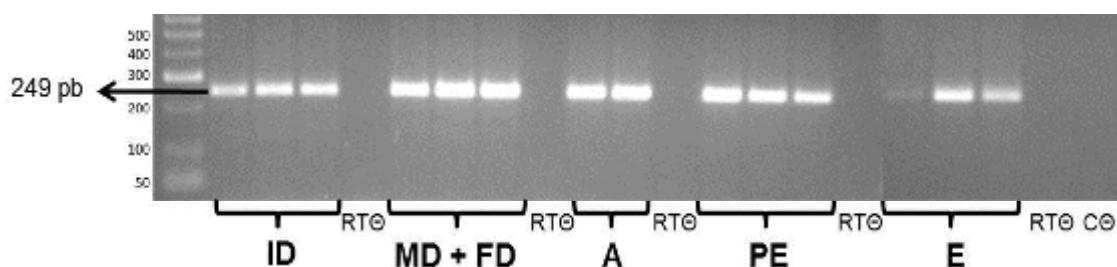
Legenda: ID – início de diestro; MD + FD – meio e fim de diestro; A – anestro; PE – pró-estro; E – estro; RT- – reacção sem adição da transcriptase reversa; CØ – Controlo negativo.

Figura 13 – Expressão de mRNA do TLR4



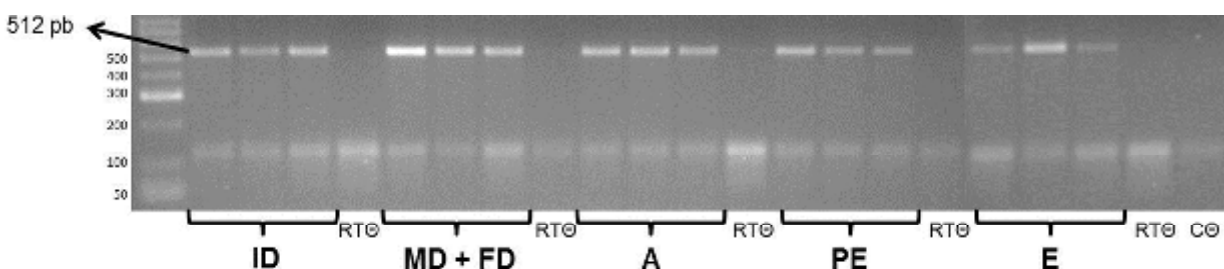
Legenda: ID – início de diestro; MD + FD – meio e fim de diestro; A – anestro; PE – pró-estro; E – estro; RT – reacção sem adição da transcriptase reversa; C – Controlo negativo.

Figura 14 – Expressão de mRNA do TLR5



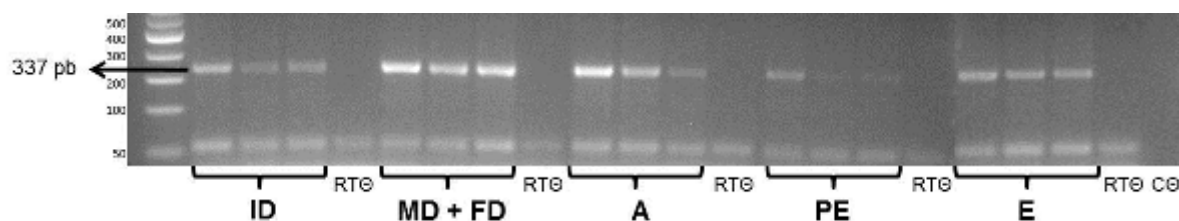
Legenda: ID – início de diestro; MD + FD – meio e fim de diestro; A – anestro; PE – pró-estro; E – estro; RT – reacção sem adição da transcriptase reversa; C – Controlo negativo.

Figura 15 – Expressão de mRNA do TLR6



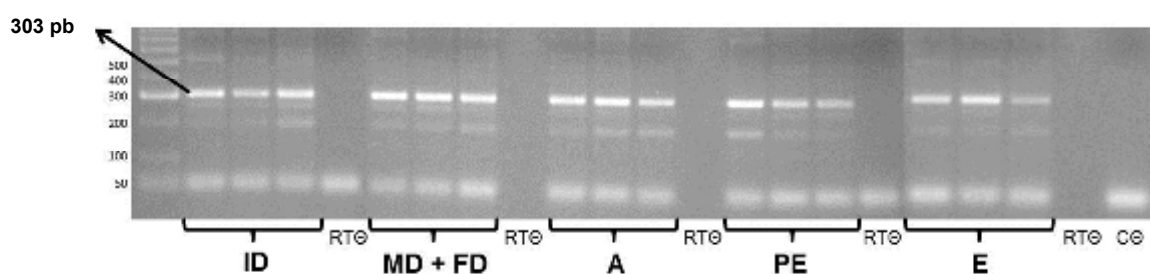
Legenda: ID – início de diestro; MD + FD – meio e fim de diestro; A – anestro; PE – pró-estro; E – estro; RT – reacção sem adição da transcriptase reversa; C – Controlo negativo.

Figura 16 – Expressão de mRNA do TLR7



Legenda: ID – início de diestro; MD + FD – meio e fim de diestro; A – anestro; PE – pró-estro; E – estro; RT- – reacção sem adição da transcriptase reversa; C- – Controlo negativo.

Figura 17 – Expressão de mRNA do TLR9



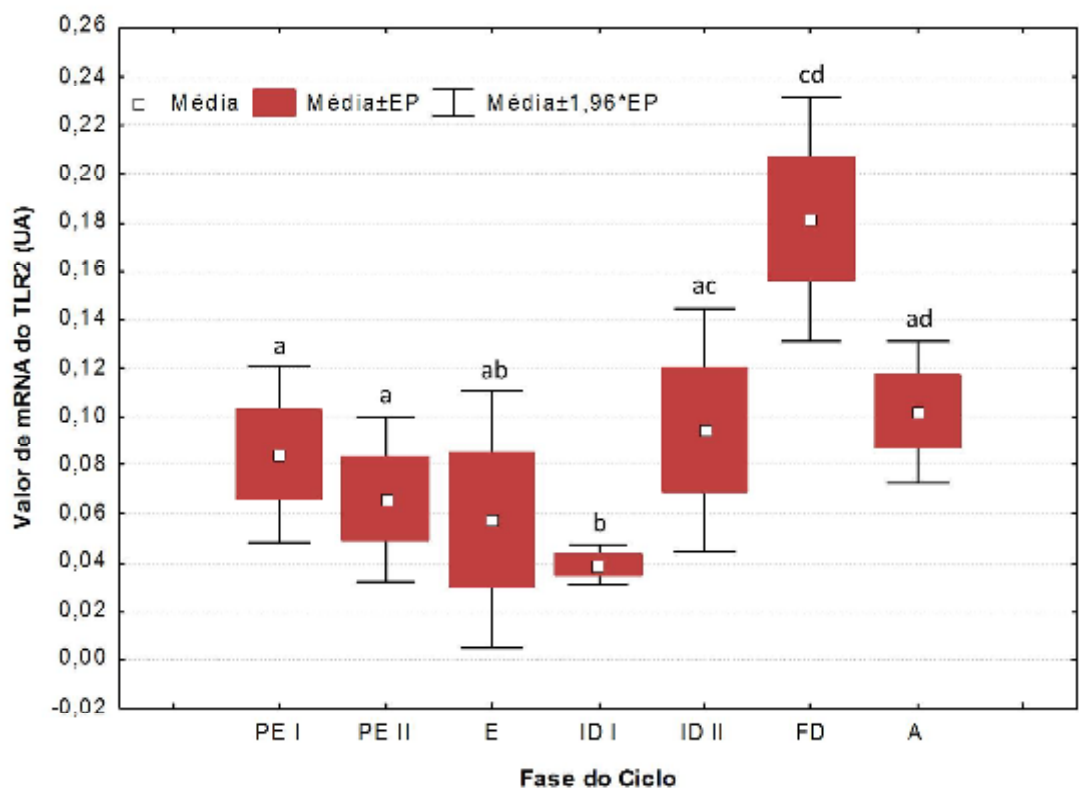
Legenda: ID – início de diestro; MD + FD – meio e fim de diestro; A – anestro; PE – pró-estro; E – estro; RT- – reacção sem adição da transcriptase reversa; C- – Controlo negativo.

3. Quantificação da expressão do mRNA dos TLRs 2 e 4 ao longo do ciclo éstrico da cadela, por PCR em Tempo Real

A quantificação da transcrição do TLR 2 ao longo do ciclo éstrico da cadela encontra-se esquematizada em baixo (Gráfico 2).

Observaram-se níveis de expressão de mRNA significativamente maiores ($p<0,05$) no final do diestro comparativamente com a fase proliferativa e ainda com o início de diestro I (0-10 dias após o pico de LH). Esta última é ainda a fase com menor nível de transcrição do TLR2 em relação às restantes, sendo esta diferença significativa ($p<0,05$) em comparação com todas as fases com excepção do estro. Entre pró-estro, estro e início de diestro II (10-30 dias após pico de LH) não existem diferenças de expressão significativas.

Gráfico 2 – Valores de expressão de mRNA do TLR2 (Unidades Arbitrárias – UA) avaliados por PCR em Tempo Real.

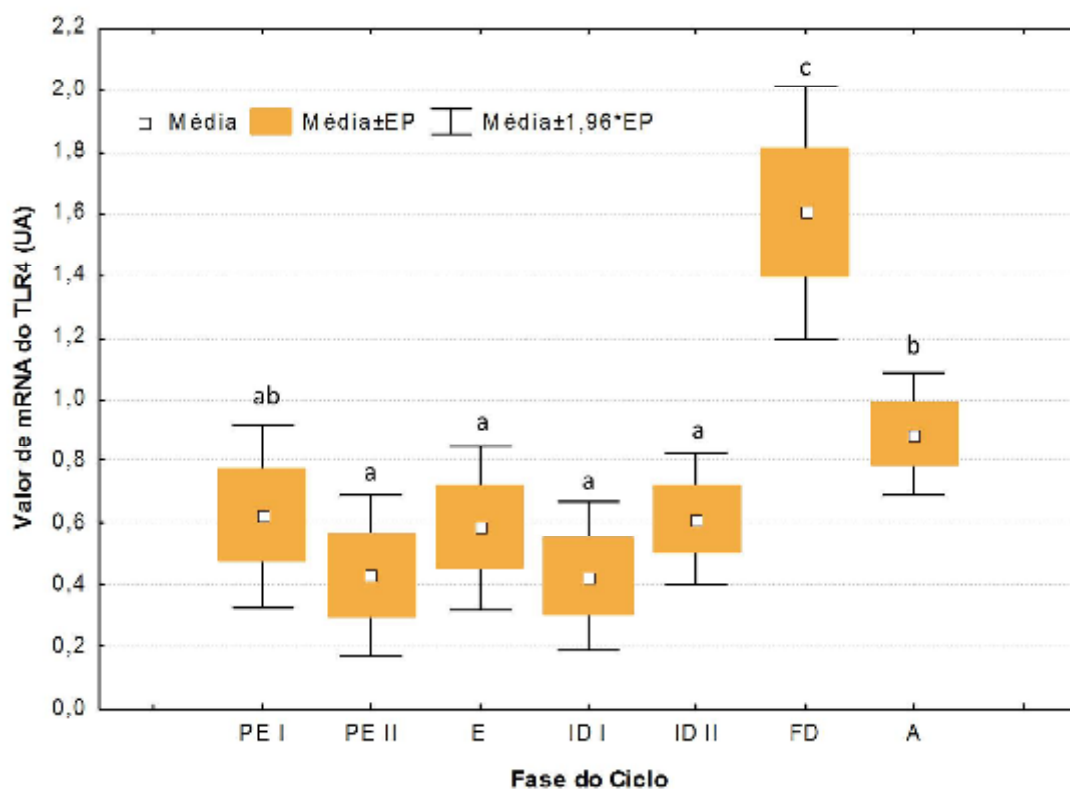


Legenda: PEI – pró-estro I; PEII – pró-estro II; E – estro; IDI – início de diestro (0-10dias); IDII – início de diestro (10-30 dias); FD – fim de diestro; A – anestro; EP – erro padrão. Letras diferentes reflectem grupos com diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$, Mann–Whitney U-test).

Em relação ao TLR4, os resultados da quantificação da sua transcrição encontram-se esquematizados em baixo (Gráfico 3).

É no final de diestro e anestro que existe maior expressão de mRNA do TLR4. No entanto, é no final de diestro que esta expressão atinge o máximo, sendo cerca de duas a quatro vezes superior à média das restantes fases. No anestro a expressão é significativamente superior ($p < 0,05$) em relação ao pró-estro II, estro e início de diestro. Entre pró-estro, estro e início de diestro não se observam diferenças significativas.

Gráfico 3 – Valores de expressão de mRNA do TLR4 (Unidades Arbitrárias – UA) avaliados por PCR em Tempo Real.



Legenda: PEI – pró-estro I; PEII – pró-estro II; E – estro; IDI – início de diestro (0-10dias); IDII – início de diestro (10-30 dias); FD – fim de diestro; A – anestro; EP – erro padrão. Letras diferentes reflectem grupos com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$, Mann–Whitney U-test).

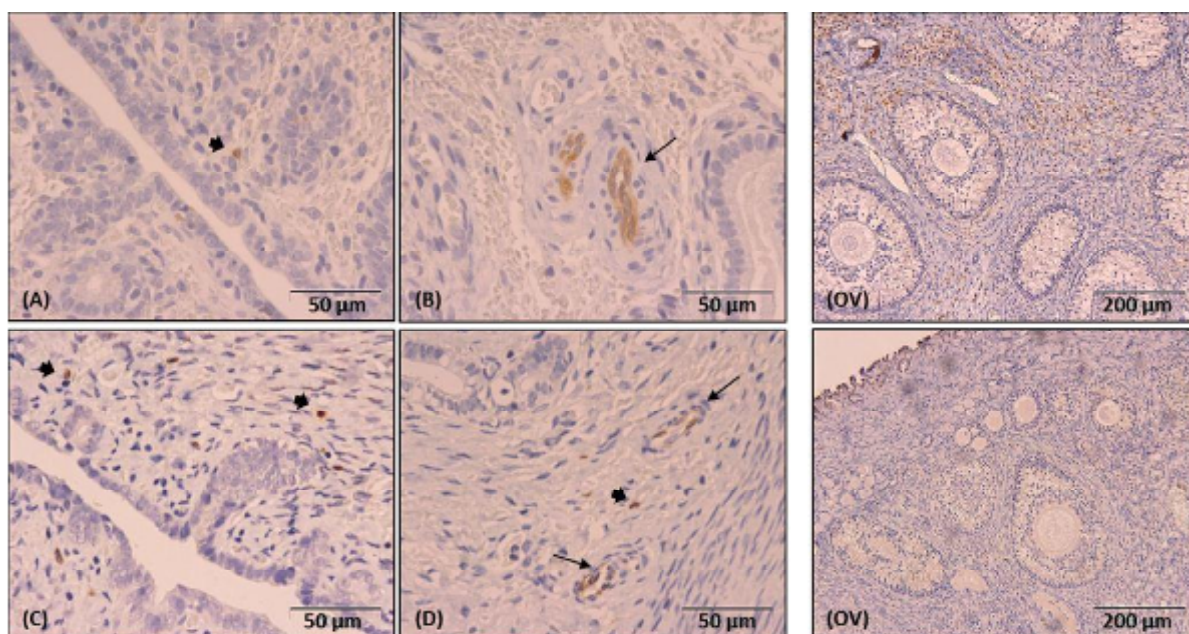
4. Cultura de explantes de endométrio

4.1. Avaliação por imunohistoquímica da COX2

A marcação da COX2 por imunohistoquímica no endométrio de cadela foi observada apenas em células de reacção inflamatória localizadas no estroma e no endotélio de alguns vasos sanguíneos. Não se visualizou marcação quer em células do estroma quer em células epiteliais em todas as amostras consideradas, mesmo naquelas de endométrio com hiperplasia quística.

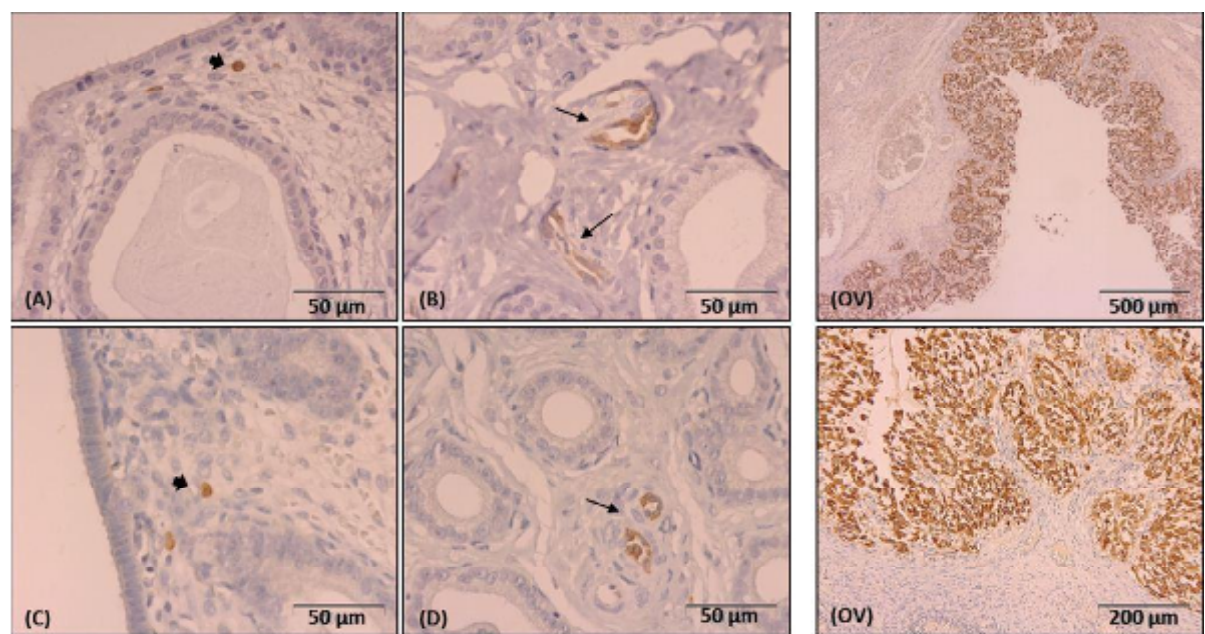
A marcação nos vasos foi mais acentuada no pró-estro e estro, diminuindo depois no início de diestro e voltando a aumentar no final de diestro e anestro. Nestas duas últimas fases observou-se, comparativamente com as restantes fases, uma maior quantidade de células inflamatórias (linfócitos e macrófagos) marcadas.

Figura 18 – Expressão da COX2 por imunohistoquímica no endométrio e no ovário na fase de pró-estro



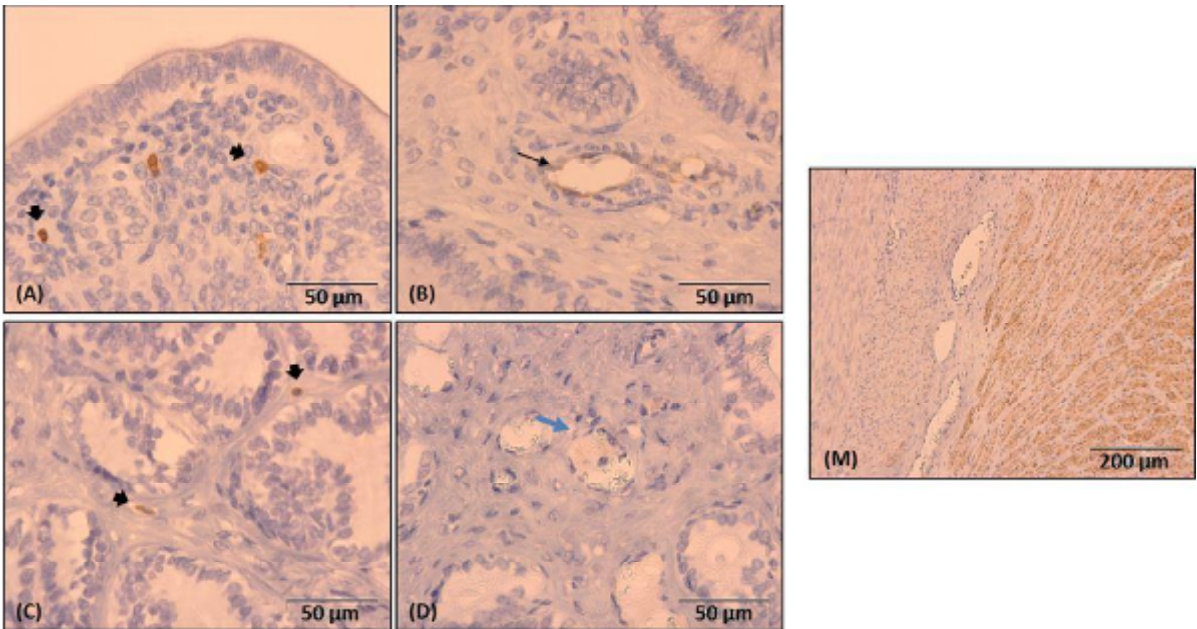
Legenda: A e C – lúmen; B e D – glândulas basais; OV – ovário; setas pretas grossas indicam células de reacção inflamatórias marcadas e setas pretas finas indicam a marcação do endotélio dos vasos.

Figura 19 – Expressão da COX2 por imunohistoquímica no endométrio e no ovário na fase de estro (pós-ovulação)



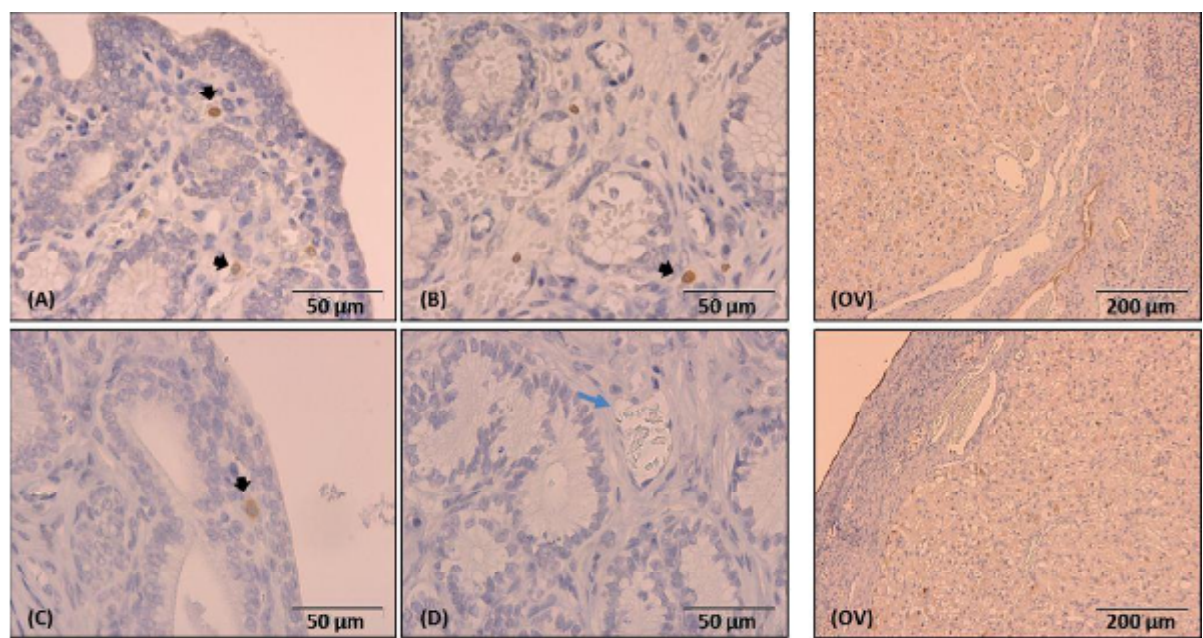
Legenda: A e C – lúmen; B e D – glândulas basais; OV – ovário, notar a forte marcação das células lúteas do corpo hemorrágico; setas pretas grossas indicam células de reacção inflamatórias marcadas e setas pretas finas indicam a marcação do endotélio dos vasos.

Figura 20 – Expressão da COX2 por imunohistoquímica no endométrio e no ovário no início de diestro (0-10 dias)



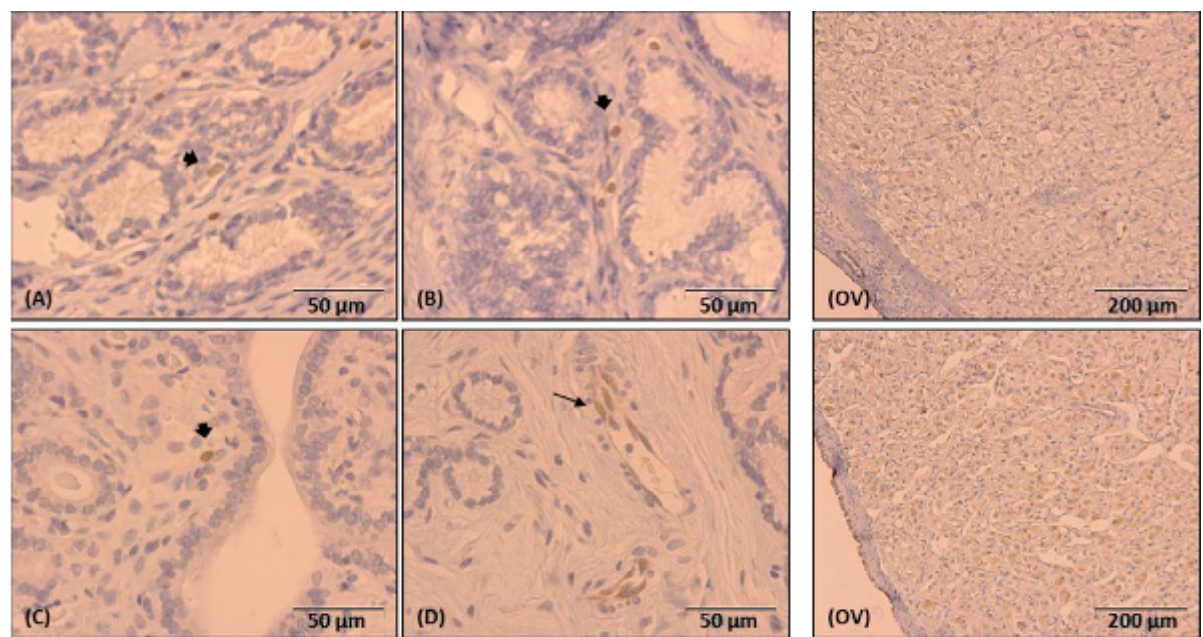
Legenda: A – lúmen; B, C e D – glândulas basais; M – miométrio; setas pretas grossas indicam células de reacção inflamatórias marcadas, setas pretas finas indicam a marcação do endotélio dos vasos e setas azuis indicam vasos não marcados.

Figura 21 – Expressão da COX2 por imunohistoquímica no endométrio e no ovário em diestro (10-30 dias)



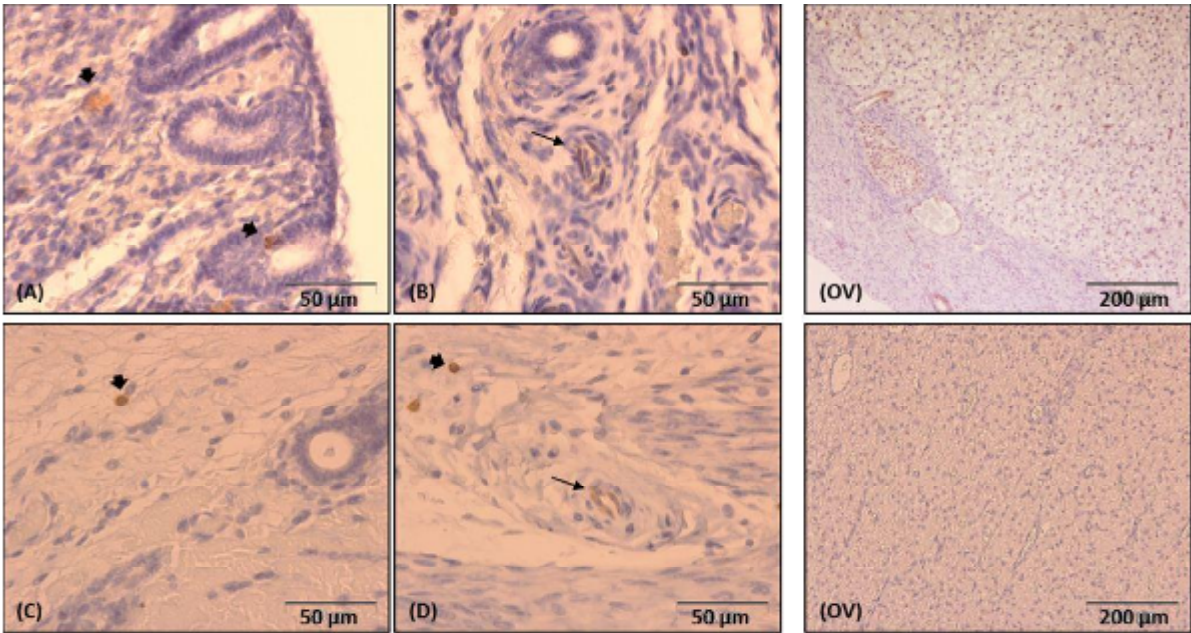
Legenda: A e C – lúmen; B e D – glândulas basais; OV – ovário, notar a marcação do corpo lúteo; setas pretas grossas indicam células de reacção inflamatórias marcadas, setas pretas finas indicam a marcação do endotélio dos vasos e setas azuis indicam vasos não marcados.

Figura 22 – Expressão da COX2 por imunohistoquímica no endométrio e no ovário na segunda metade de diestro (30-40 dias)



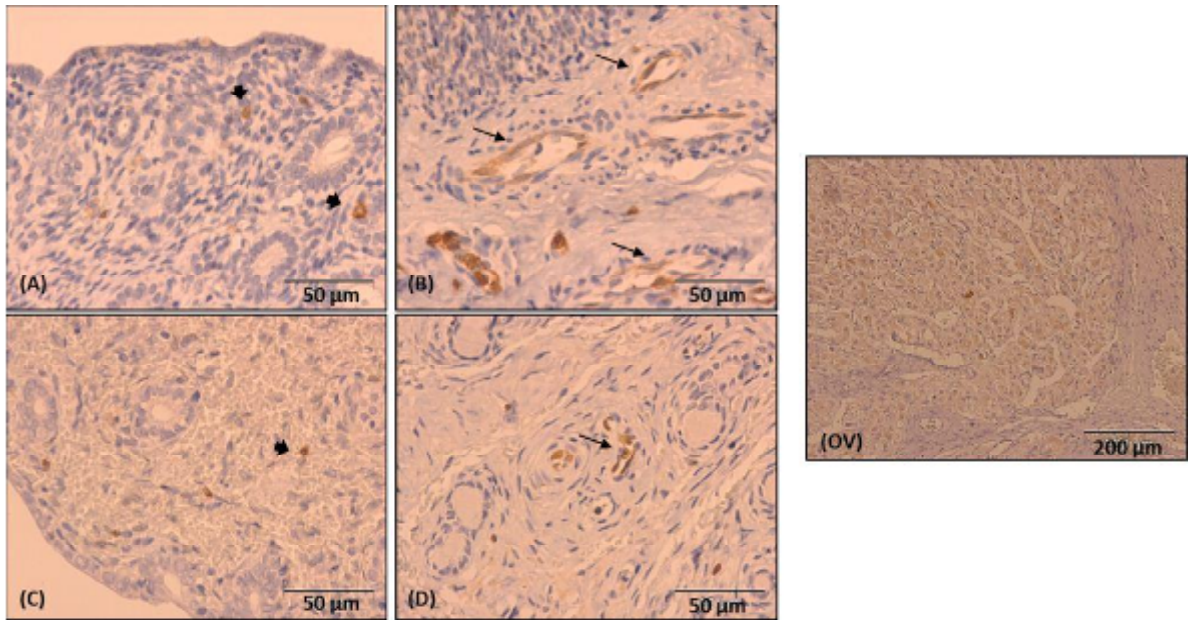
Legenda: A e C – lúmen; B e D – glândulas basais; OV – ovário; setas pretas grossas indicam células de reacção inflamatórias marcadas, setas pretas finas indicam a marcação do endotélio dos vasos.

Figura 23 – Expressão da COX2 por imunohistoquímica no endométrio e no ovário no final de diestro



Legenda: A – lúmen; B, C e D – glândulas basais; OV – ovário; setas pretas grossas indicam células de reacção inflamatórias marcadas, setas pretas finas indicam a marcação do endotélio dos vasos.

Figura 24 – Expressão da COX2 por imunohistoquímica no endométrio e no ovário na fase de anestro



Legenda: A e C – lúmen; B e D – glândulas basais; OV – ovário; setas pretas grossas indicam células de reacção inflamatórias marcadas, setas pretas finas indicam a marcação do endotélio dos vasos.

Tabela 4 – Marcação por imunohistoquímica da COX2 em cortes consecutivos de útero, ao longo do ciclo éstrico da cadela.

Fase	Ep. luminal	Glândulas	Estroma	Vasos	Cél. Inflam.	Miométrio
PE	-	-	-	++	++	+
E	-	-	-	++	++	+
ID	-	-	-	+	++	+
FD	-	-	-	++	+++	+
A	-	-	-	++	+++	+

Legenda: Ep. Luminal – epitélio luminal; Cél. Inflam. – Células de reacção inflamatória; PE – pró-estro; E – estro; ID – início de diestro; FD – final de diestro; A – anestro; (-) – ausência de marcação; (+) – marcação positiva.

4.2. Doseamento de prostaglandinas

Para o doseamento de PGF_{2α} e de PGE₂ foram utilizadas 27 amostras de endométrio, sendo estas de diferentes fases do ciclo éstrico (Fase Folicular: n=9; Início de Diestro: n=8; Final de Diestro: n=6; Anestro: n=4).

Após a análise dos resultados verificou-se que nos controlos negativos sem tecido (apenas meio de cultura) a produção de prostaglandinas foi inferior aos limites de detecção, o que sugere a ausência de contaminação das culturas.

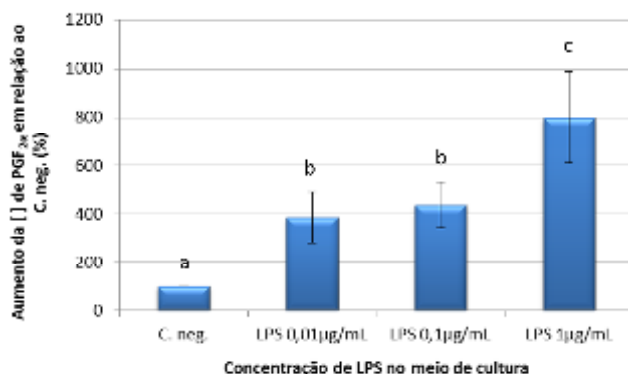
4.2.1.Dose-efeito

Devido ao facto das amostras de endométrio utilizadas na caracterização da produção de PGF_{2α} e de PGE₂ em função da concentração de LPS ou LTA serem de diferentes fases do ciclo éstrico (n=4), a análise estatística destes resultados foi feita em função da percentagem de aumento em relação à produção pelo tecido não estimulado (Gráficos 4 a 7).

A estimulação dos explantes de endométrio com LPS e com LTA induziu a produção tanto de PGF_{2α} como de PGE₂, em qualquer das concentrações utilizadas comparativamente com os controlos negativos com tecido (tecido não estimulado). Concentrações mais elevadas de LPS resultaram em maiores concentrações de PGF_{2α} (p<0.01) e PGE₂ (p<0.01) produzidas, sendo esta diferença significativamente maior na concentração de 1µg/mL (Gráficos 4 e 5). Relativamente à estimulação com LTA, a produção de PGF_{2α} e de PGE₂ foi superior àquela observada (p<0,05) em tecido não estimulado (Gráficos 6 e 7). Não houve diferença na

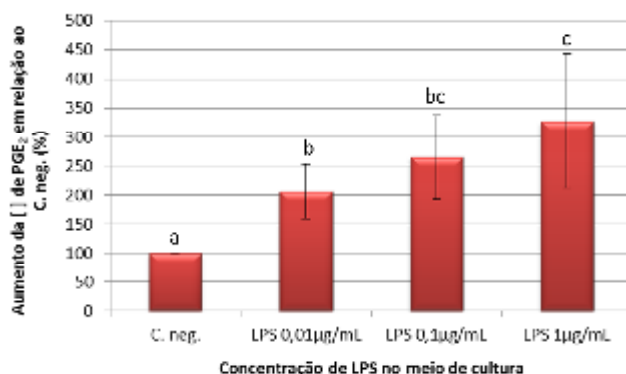
produção de PGE_2 e de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelos explantes, quando estimulados com as concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$. Deste modo, a concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS e LTA foi seleccionada para a estimulação dos explantes.

Gráfico 4 – Percentagem de aumento de $\text{PGF}_{2\alpha}$, relativamente ao tecido não estimulado (C. neg.), em função da concentração de LPS.



Letras diferentes reflectem grupos com diferenças estatisticamente significativas (^{ab;ac} $p < 0,001$; ^{bc} $p < 0,01$).

Gráfico 5 – Percentagem de aumento de PGE_2 , relativamente ao tecido não estimulado (C. neg.), em função da concentração de LPS.



Letras diferentes reflectem grupos com diferenças estatisticamente significativas (^{ab;bc} $p < 0,01$; ^{ac} $p < 0,001$).

Gráfico 6 – Percentagem de aumento de $\text{PGF}_{2\alpha}$, relativamente ao tecido não estimulado (C. neg.), em função da concentração de LTA ($p < 0,01$).

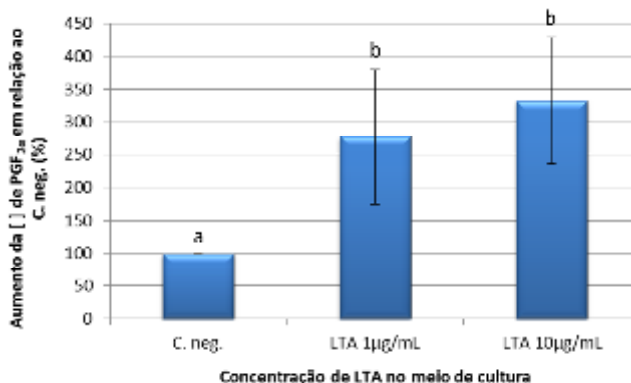
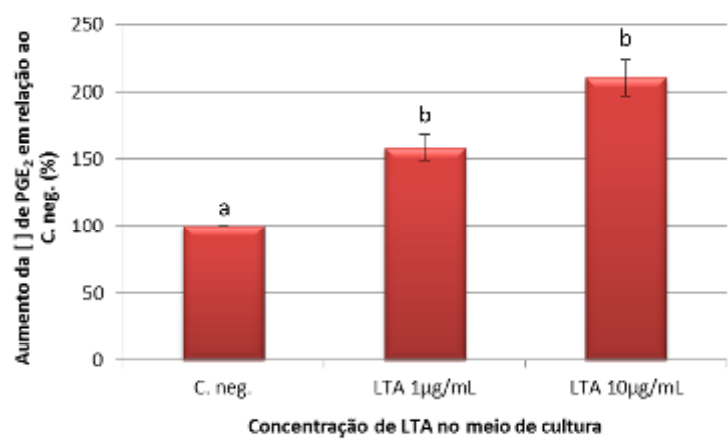


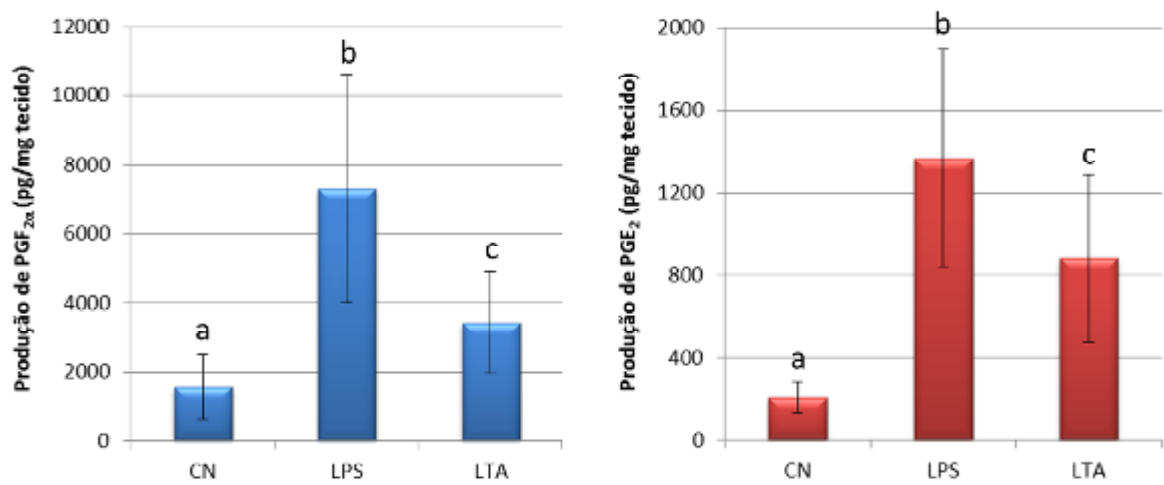
Gráfico 7 – Percentagem de aumento de PGE₂, relativamente ao tecido não estimulado (C. neg.), em função da concentração de LTA. (p<0,05).



4.2.2. Produção de prostaglandinas em função da fase do ciclo éstrico

De uma maneira geral, a estimulação do tecido com LPS levou a uma maior produção de PGF_{2α} e de PGE₂ do que a estimulação pelo LTA (p<0,05). A produção de PGF_{2α} e de PGE₂ pelo tecido não estimulado foi sempre inferior à produção desta PG após estimulação com LTA (PGF_{2α} p< 0,01; PGE₂ p< 0,0001) e LPS (p< 0,0001) (Gráficos 8 e 9).

Gráficos 8 e 9 - Produção de PGF_{2α} e de PGE₂ (pg/mg de tecido) em tecido não estimulado (CN) e estimulado com LPS e LTA.

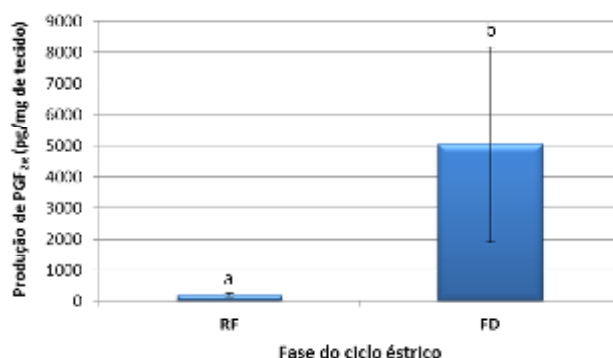


Os resultados encontram-se representados relativamente à média e erro padrão de todas as amostras consideradas (n=27). Letras diferentes reflectem grupos com diferenças estatisticamente significativas (PGE₂:^{ab,ac}p<0,0001; ^{bc}p<0,05; PGF_{2α}:^{ab}p<0,0001; ^{bc}p<0,01; ^{ac}p<0,05).

4.2.2.1. Produção basal pelo tecido não estimulado

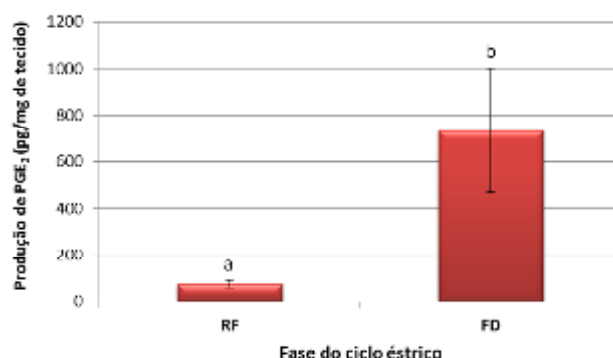
A produção basal de PGE_2 ($p < 0,05$) e de $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($p < 0,001$) pelo tecido não estimulado de fim de diestro foi superior à produção basal dos tecidos nas fases folicular, início de diestro e anestro. Pelo facto de não ter havido diferença na produção basal de PGs entre as restantes fases *versus* fim de diestro, as concentrações destes grupos (FF, ID, A) foram agrupadas (Gráficos 10 e 11).

Gráfico 10 – Produção basal de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em tecido não estimulado em final de diestro e restantes fases (pg/mg de tecido).



Legenda: RF – restantes fases (Fase Folicular, Diestro, Anestro); FD- Final de Diestro; Letras diferentes reflectem grupos com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$).

Gráfico 11 – Produção basal de PGE_2 em tecido não estimulado em final de diestro e restantes fases (pg/mg de tecido).



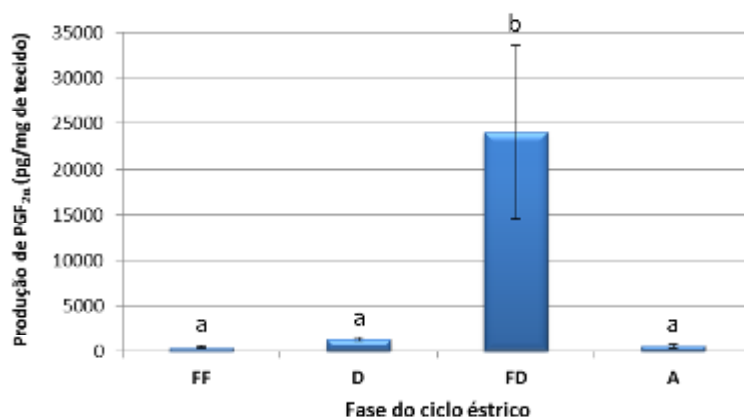
Legenda: RF – restantes fases (Fase Folicular, Diestro, Anestro); FD- Final de Diestro. Letras diferentes reflectem grupos com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

No entanto, a produção basal de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelos explantes de início de diestro ($340,7 \pm 98,7$ pg/mg tecido) foi superior à produzida pelos explantes da fase folicular ($110,9 \pm 50,3$ pg/mg tecido; pró-estro e estro), quando só se comparam estas duas fases ($p < 0,01$). Em relação à PGE_2 , não foram observadas diferenças entre a produção basal pelo tecido da fase folicular ($87,3 \pm 34,5$ pg/mg tecido) e início de diestro ($108,3 \pm 52,6$ pg/mg tecido).

4.2.2.2. Produção após estimulação com LPS

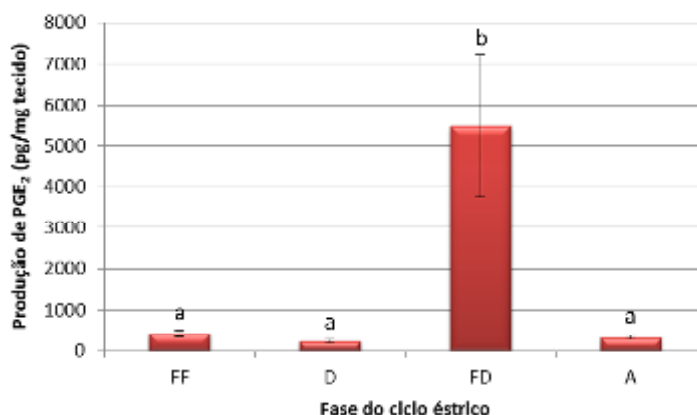
A produção de prostaglandinas após a estimulação dos explantes com LPS foi significativamente superior no final de diestro, em comparação com as restantes fases, tanto para $\text{PGF}_{2\alpha}$ como para PGE_2 ($p < 0,001$) (Gráficos 12 e 13).

Gráfico 12 – Produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ após estimulação dos explantes com LPS (pg/mg de tecido), ao longo do ciclo éstrico.



Legenda: FF – fase folicular; D – diestro; FD- final de diestro; A – anestro. Letras diferentes reflectem grupos com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$)

Gráfico 13 – Produção de PGE_2 após estimulação dos explantes com LPS (pg/mg de tecido), ao longo do ciclo éstrico.



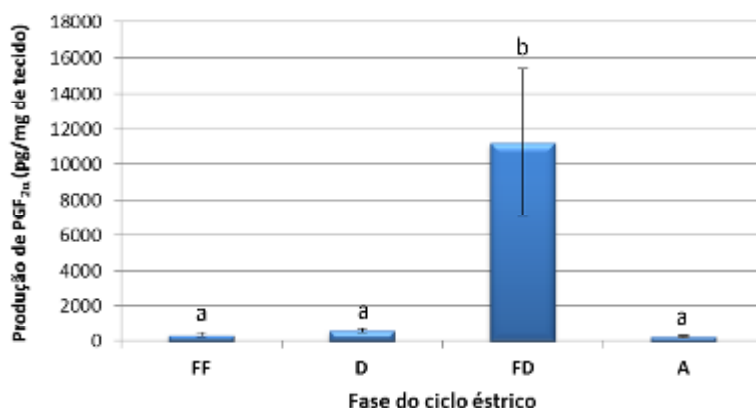
Legenda: FF – fase folicular; D – diestro; FD- final de diestro; A – anestro. Letras diferentes reflectem grupos com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$).

Porém, a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelos explantes de início de diestro ($1310,5 \pm 244,6$ pg/mg tecido) foi superior à produzida pelos explantes da fase folicular ($410,9 \pm 104,6$ pg/mg tecido; pró-estro e estro), quando só se comparam estas duas fases ($p < 0,01$). Em relação à PGE_2 , não foram observadas diferenças entre a fase folicular ($439,7 \pm 83,6$ pg/mg tecido) e início de diestro ($366,5 \pm 136,1$ pg/mg tecido).

4.2.2.3. Produção após estimulação com LTA

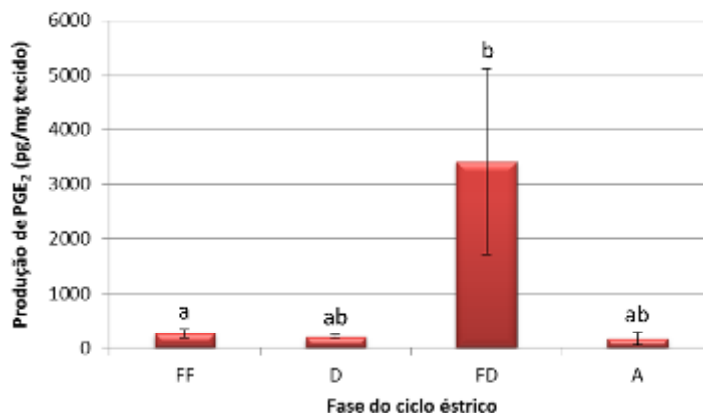
À semelhança do que verificou com a estimulação com LPS, a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e de PGE_2 após estimulação dos explantes com LTA foi também superior no final de diestro em comparação com restantes fases ($p < 0,001$; Gráficos 14 e 15).

Gráfico 14 – Produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ após estimulação dos explantes com LTA (pg/mg de tecido), ao longo do ciclo éstrico.



Legenda: FF – fase folicular; D – diestro; FD- final de diestro; A – anestro. Letras diferentes reflectem grupos com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$).

Gráfico 15 – Produção de PGE_2 após estimulação dos explantes com LTA (pg/mg de tecido), ao longo do ciclo éstrico.



Legenda: FF – fase folicular; D – diestro; FD- final de diestro; A – anestro. Letras diferentes reflectem grupos com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

No entanto, a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelos explantes de início de diestro ($574,4 \pm 108,1$ pg/mg tecido) foi superior à produzida pelos explantes da fase folicular ($325,5 \pm 117,9$ pg/mg tecido; pró-estro e estro), quando só se comparam estas duas fases ($p < 0,05$). Em relação à PGE_2 , não foram observadas diferenças entre a produção pelo tecido da fase folicular ($257,1 \pm 83,8$ pg/mg tecido) e início de diestro ($255,7 \pm 63,1$ pg/mg tecido).

4.2.2.4. Produção entre endométrio normal e endométrio com hiperplasia quística

Não se observaram diferenças na produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e de PGE_2 entre explantes de endométrio com e sem HQE de fase folicular, início de diestro e anestro, sendo esta sempre bastante reduzida. Em final de diestro com HQE observou-se em certas amostras um aumento de produção. No entanto, e na medida em que a síntese de prostaglandinas já se encontra aumentada nesta fase, não se conseguiu atribuir este incremento à presença de HQE.

4.3.Quantificação relativa da expressão de mRNA para os genes de enzimas envolvidas na síntese de prostaglandinas e dos TLRs, por PCR em Tempo Real

Os explantes de endométrio expressaram mRNA das enzimas PGES, PGFS, COX2 e ainda dos TLRs 2 e 4. Todos os produtos amplificados tiveram a massa molecular esperada, não se observando amplificação nos controlos negativos NTC, nos quais se utilizou H₂O em vez de cDNA (Figuras 25 a 27).

Figura 25 – Produtos de PCR (PGES, COX2, TLR2) analisados por electroforese em gel de agarose.

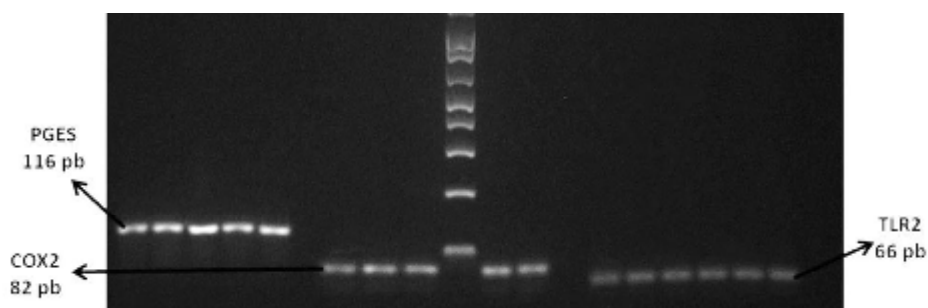


Figura 26 – Produtos de PCR (TLR4) analisados por electroforese em gel de agarose.

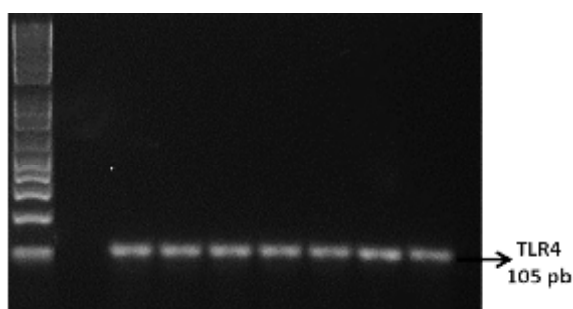
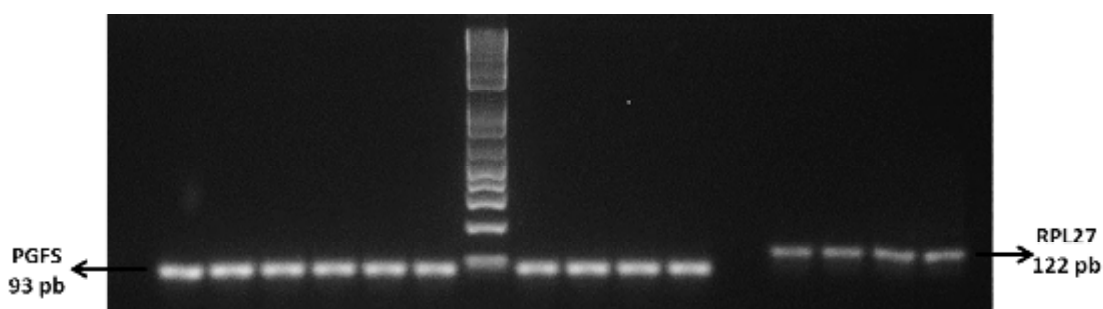


Figura 27 – Produtos de PCR (PGFS, RPL27) analisados por electroforese em gel de agarose.



Os gráficos seguintes mostram as expressões génicas obtidas, ao nível do mRNA transcrito, para cada um dos genes estudados por PCR em Tempo Real, após a incubação dos explantes de endométrio.

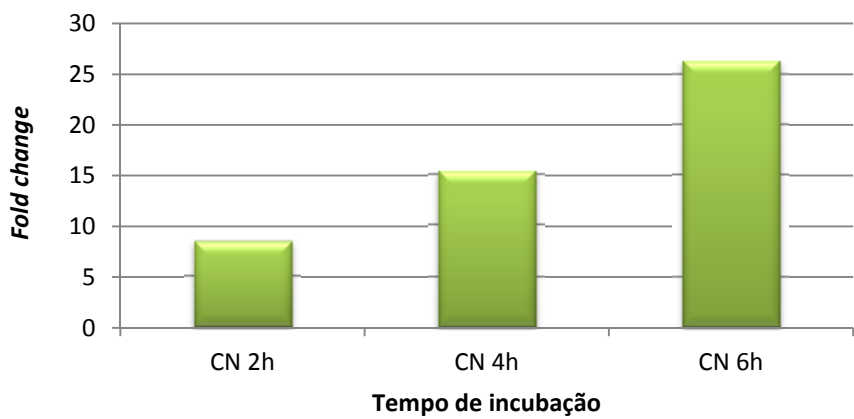
4.3.1. Expressão do mRNA dos genes de enzimas envolvidas na síntese de prostaglandinas e dos TLRs 2 e 4 em endométrio não estimulado

Uma vez que as amostras de endométrio utilizadas para a realização de PCR em Tempo Real foram de diferentes fases do ciclo éstrico, a análise dos resultados foi feita individualmente, não tendo sido possível fazer o tratamento estatístico desses resultados.

Duas horas após o início da incubação, pôde-se observar um aumento da expressão do mRNA da COX2 e da PGES nos controlos negativos com tecido (endométrio não estimulado), o que provavelmente estará associado à agitação a que os tecidos estão sujeitos durante a incubação. Dependendo da amostra, este aumento manteve-se até às 24 horas. No entanto, verificou-se nalguns casos uma diminuição da transcrição destes genes entre as 4 e as 6 horas (PGES – Gráficos 16 a 18; COX2 – Gráficos 19-22).

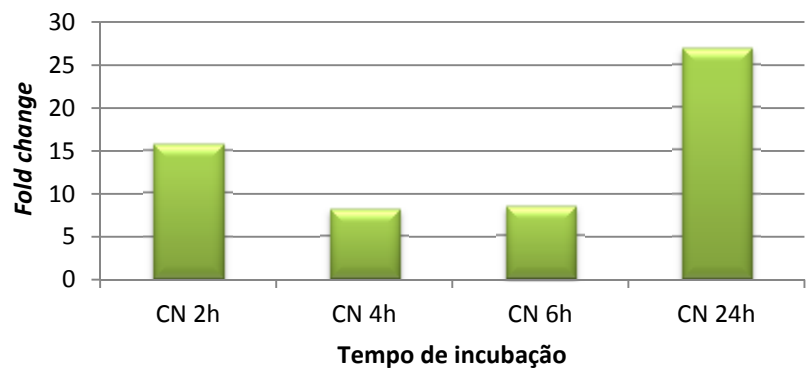
Relativamente aos restantes genes avaliados, PGFS, TLR2 e TLR4, não se observaram diferenças na expressão do mRNA no tecido não estimulado entre as 0 e as restantes horas (dados não fornecidos).

Gráfico 16 – Razão entre os valores relativos do mRNA da PGES em tecido endometrial não estimulado ao longo de 6 horas de incubação e os do tecido não estimulado às 0 horas. Explantes de endométrio da cadela nº24, em meio de diestro (30-40dias).



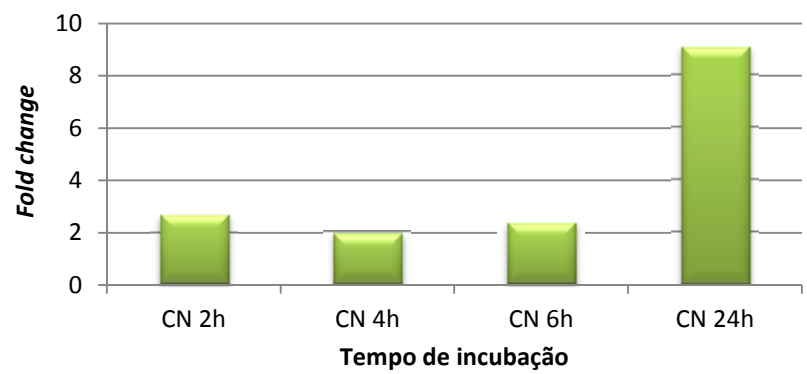
Legenda: CN – tecido não estimulado.

Gráfico 17 – Razão entre os valores relativos do mRNA da PGES em tecido endometrial não estimulado ao longo de 24 horas de incubação e os do tecido não estimulado às 0 horas. Explantes de endométrio da cadela nº26, em final de diestro.



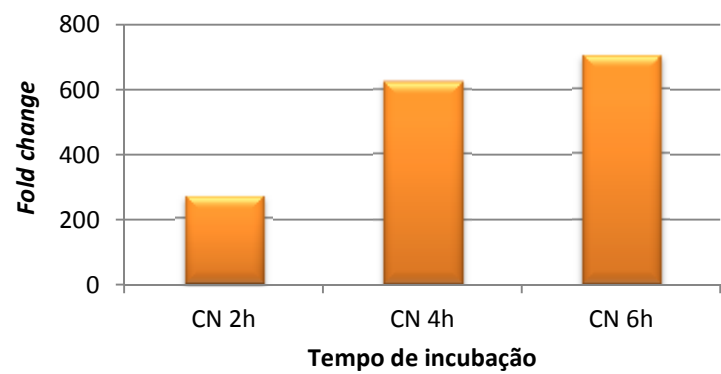
Legenda: CN – tecido não estimulado.

Gráfico 18 – Razão entre os valores relativos do mRNA da PGES em tecido endometrial não estimulado ao longo de 24 horas de incubação e os do tecido não estimulado às 0 horas. Explantes de endométrio da cadela nº27, em estro.



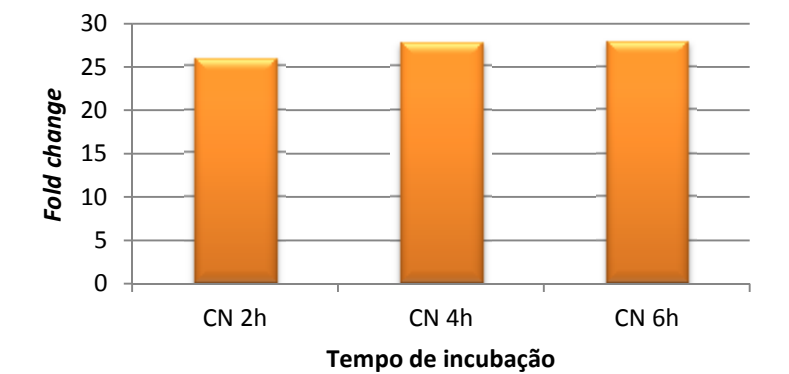
Legenda: CN – tecido não estimulado.

Gráfico 19 – Razão entre os valores relativos do mRNA da COX2 em tecido endometrial não estimulado ao longo de 6 horas de incubação e os do tecido não estimulado às 0 horas. Explantes de endométrio da cadela nº24, em meio de diestro (30-40dias).



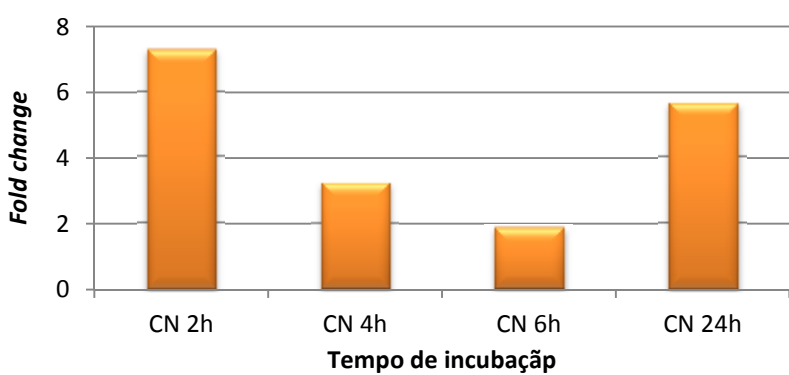
Legenda: CN – tecido não estimulado.

Gráfico 20 – Razão entre os valores relativos do mRNA da COX2 em tecido endometrial não estimulado ao longo de 24 horas de incubação e os do tecido não estimulado às 0 horas. Explantes de endométrio da cadela nº25, em final de diestro com HQE.



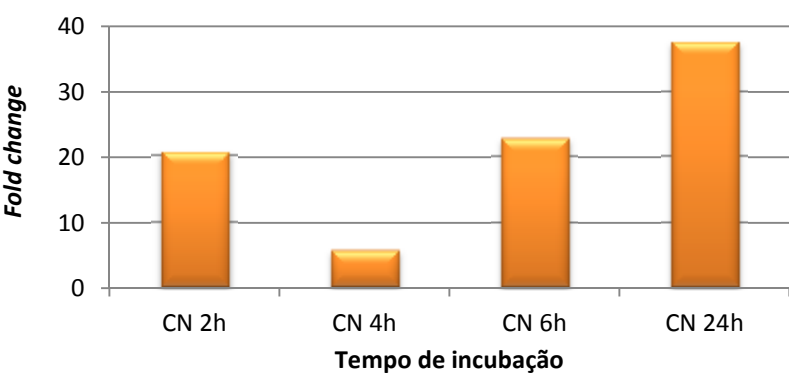
Legenda: CN – tecido não estimulado

Gráfico 21 – Razão entre os valores relativos do mRNA da COX2 em tecido endometrial não estimulado ao longo de 24 horas de incubação e os do tecido não estimulado às 0 horas. Explantes de endométrio da cadela nº26, em final de diestro.



Legenda: CN – tecido não estimulado.

Gráfico 22 – Razão entre os valores relativos do mRNA da COX2 em tecido endometrial não estimulado ao longo de 24 horas de incubação e os do tecido não estimulado às 0 horas. Explantes de endométrio da cadela nº27, em estro.



Legenda: CN – tecido não estimulado.

4.3.2. Expressão do mRNA da PGES após estimulação dos explantes de endométrio

Os resultados da quantificação relativa da expressão do mRNA da PGES, analisada por PCR em Tempo Real, encontram-se representados nos Gráficos 23 a 26. Nos valores apresentados já está descontado o efeito do factor agitação mecânica (valores do tecido não estimulado ao longo da incubação).

Observa-se, com excepção dos explantes de endométrio da cadela nº25 (final de diestro com HQE), um aumento da expressão do mRNA da PGES ao longo da estimulação, comparativamente com o tecido não estimulado. O aumento mais significativo foi atingido com estimulação com LPS, comparativamente com a estimulação com LTA, sendo o pico de expressão do mRNA da PGES atingido às 6 horas em todas as amostras analisadas. Às 24 horas verificou-se um decréscimo na transcrição dos genes desta enzima comparativamente com as restantes horas.

Gráfico 23 – Avaliação da variação relativa do mRNA da PGES (em %) verificado após estimulação, com LPS e LTA, em relação ao tecido não estimulado às 0 horas. Explantes de endométrio da cadela nº24, em meio de diestro (30-40dias).

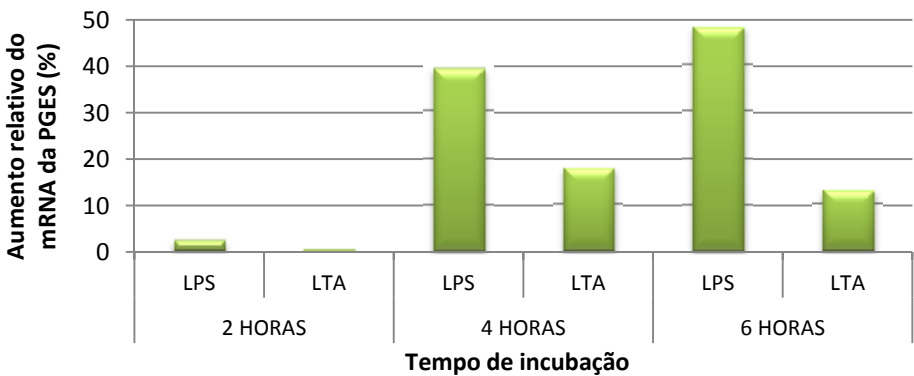


Gráfico 24 – Avaliação da variação relativa do mRNA da PGES (em %) verificado após estimulação, com LPS e LTA, em relação ao tecido não estimulado às 0 horas. Explantes de endométrio da cadela nº25, em final de diestro com HQE.

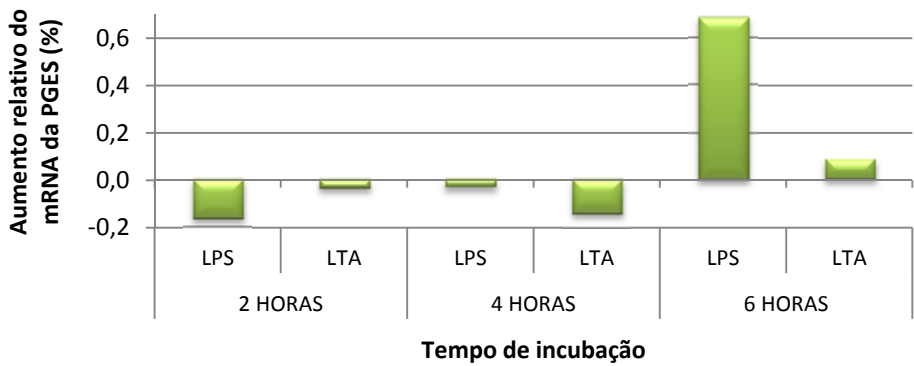


Gráfico 25 – Avaliação da variação relativa do mRNA da PGES (em %) verificado após estimulação, com LPS e LTA, em relação ao tecido não estimulado às 0 horas. Explantes de endométrio da cadela nº26, em final de diestro.

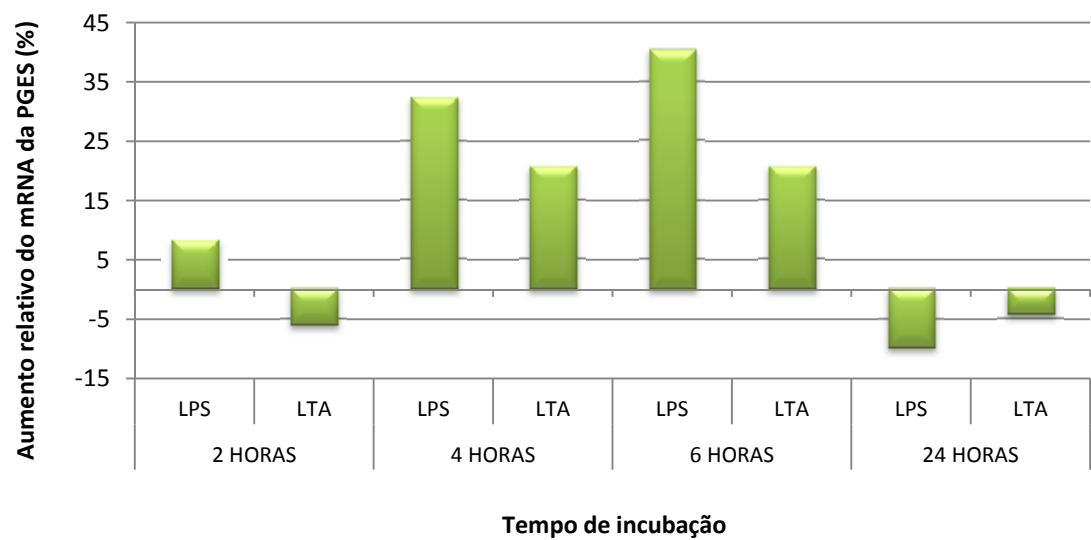
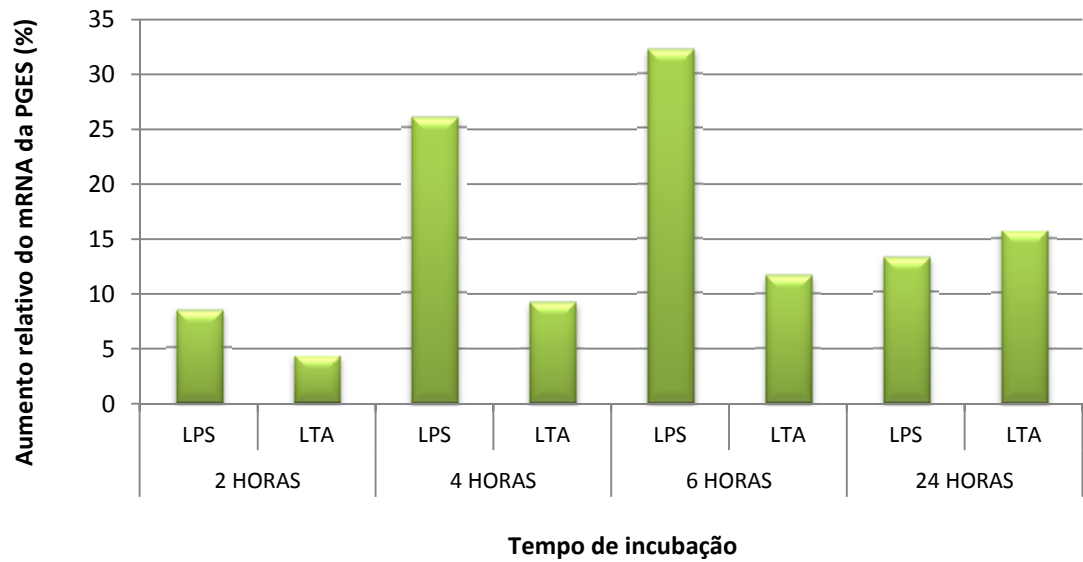


Gráfico 26 – Avaliação da variação relativa do mRNA da PGES (em %) verificado após estimulação, com LPS e LTA, em relação ao tecido não estimulado às 0 horas. Explantes de endométrio da cadela nº27, em estro.



4.3.3.Expressão do mRNA da COX2 após estimulação dos explantes de endométrio

Os resultados da quantificação relativa da expressão do mRNA da COX2, analisada por PCR em Tempo Real, encontram-se representados nos Gráficos 27 a 30. Nos valores apresentados já está descontado o efeito do factor agitação mecânica (valores do tecido não estimulado ao longo da incubação).

Observou-se, em todas as amostras analisadas, um aumento da transcrição do gene da COX2 ao longo da estimulação com LPS, comparativamente com os controlos negativos. O aumento mais significativo foi atingido com estimulação com LPS, sendo o pico de expressão do mRNA da COX2 atingido às 4, 6 e 24 horas, consoante a amostra de endométrio. Relativamente à estimulação dos explantes com LTA não se observaram alterações a nível do mRNA transcrito ao longo da incubação, com excepção dos explantes de endométrio das cadelas nº26 (em final de diestro) e nº27 (em estro).

Gráfico 27 – Avaliação da variação relativa do mRNA da COX2 (em %) verificado após estimulação, com LPS e LTA, em relação ao tecido não estimulado às 0 horas. Explantes de endométrio da cadela nº24, em meio de diestro (30-40dias).

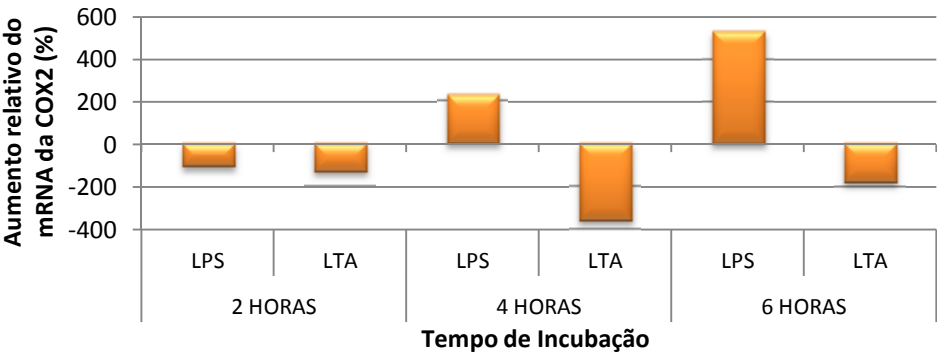


Gráfico 28 – Avaliação da variação relativa do mRNA da COX2 (em %) verificado após estimulação, com LPS e LTA, em relação ao tecido não estimulado às 0 horas. Explantes de endométrio da cadela nº25, em final de diestro com HQE.

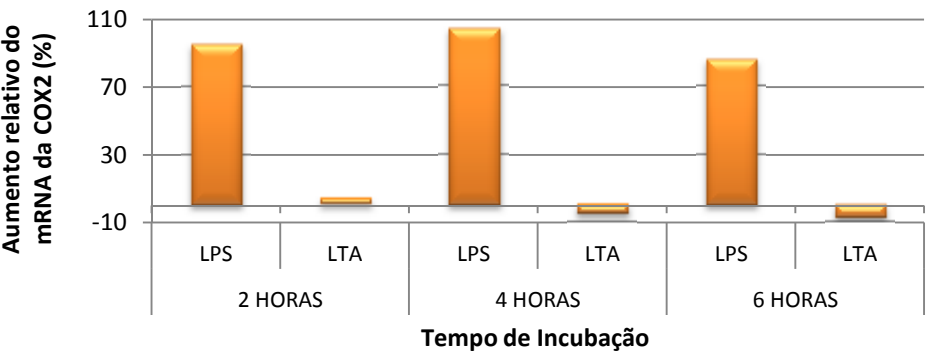


Gráfico 29 – Avaliação da variação relativa do mRNA da COX2 (em %) verificado após estimulação, com LPS e LTA, em relação ao tecido não estimulado às 0 horas. Explantes de endométrio da cadela nº26, em final de diestro.

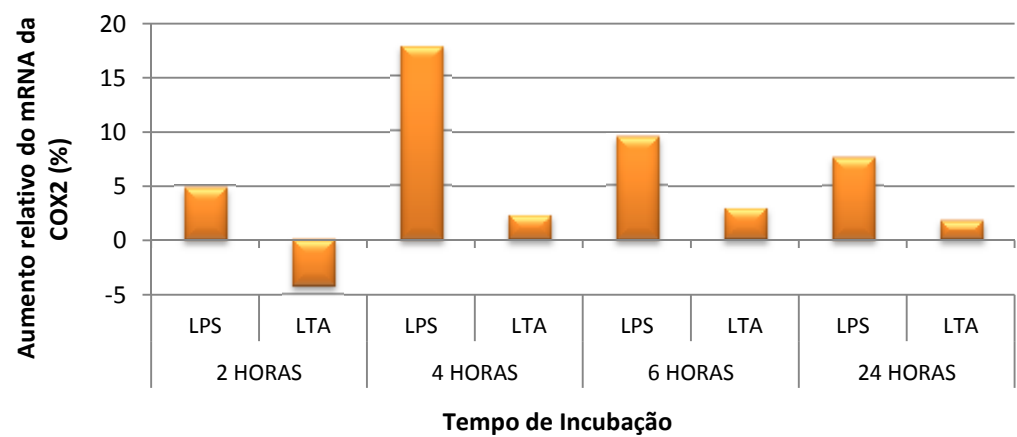
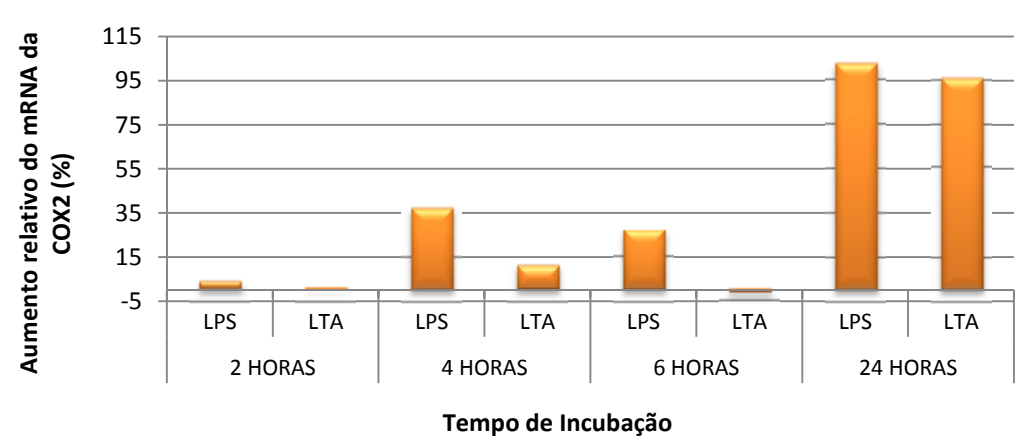


Gráfico 30 – Avaliação da variação relativa do mRNA da COX2 (em %) verificado após estimulação, com LPS e LTA, em relação ao tecido não estimulado às 0 horas. Explantes de endométrio da cadela nº27, em estro.



4.3.4. Expressão do mRNA da PGFS e dos TLRs 2 e 4 após estimulação dos explantes de endométrio

Não se observaram alterações significativas na transcrição da PGFS, TLR2 e TLR4 após a estimulação dos explantes com LPS e LTA, em nenhum dos tempos de incubação considerados (resultados não fornecidos). No entanto, relativamente à expressão de mRNA da PGFS verificou-se que este já se encontrava bastante elevado no controlo negativo às 0 horas (tecido não estimulado), excepto nas amostras de endométrio da cadela nº 27.

VI – DISCUSSÃO

1. Expressão do mRNA dos TLRs no endométrio da cadela e sua quantificação por PCR em Tempo Real ao longo do ciclo éstrico

O endométrio evoluiu por forma a orquestrar diversas funções essenciais que vão desde a implantação e a gestação até à defesa contra organismos invasores. Constitui assim uma barreira fundamental na defesa uterina contra a infecção ascendente de agentes patogénicos do aparelho reprodutor feminino. Deste modo, como importantes detectores de agentes estranhos ao organismo, esperava-se a presença dos diversos TLRs neste tecido. No entanto, até ao momento não se conhecem estudos sobre a presença dos mesmos no endométrio da cadela.

Neste estudo detectou-se a presença dos mRNAs dos TLRs 1-7 e ainda do TLR9 no endométrio de cadela em todas as fases do ciclo éstrico. Os resultados obtidos são consistentes com estudos já realizados em humanos, tanto por RT-PCR como por imunohistoquímica, nos quais se detectou a expressão do mRNA dos TLRs 1 a 10 no endométrio (Fazeli et al., 2005; Aflatoonian et al., 2007). Com excepção do TLR 10, a expressão do mRNA dos TLR1-9 foi detectada em linhas puras de células endometriais (ECC-1) (Schaefer, Desouza, Fahey, Beagley & Wira, 2004) e em culturas primárias de células epiteliais uterinas (Schaefer, Fahey, Wright & Wira, 2005). Da mesma forma, a transcrição dos genes dos TLRs foi também demonstrada no endométrio bovino (Davies et al., 2008). Estes autores verificaram a expressão dos mRNAs dos TLRs 1 a 10 no tecido endometrial enquanto em culturas primárias de células endometriais epiteliais apenas detectaram a expressão dos mRNAs dos TLRs 1 a 7 e ainda do TLR9. Em culturas primárias de células do estroma apenas verificaram a transcrição dos genes dos TLRs 1 a 4, 6, 7, 9 e 10.

Tais diferenças na transcrição dos genes dos TLRs reflectem a necessidade de, no futuro, se elaborarem estudos em culturas puras de células endometriais de cadela, uma vez que as amostras de tecido endometrial possuem uma grande variedade de células entre as quais células do sistema imunitário (macrófagos e linfócitos). Estas, uma vez activadas, expressam à sua superfície diversos receptores entre os quais os TLRs (Ozinsky et al., 2000).

Com estes resultados pode-se afirmar que, à semelhança do que se passa em humanos e em bovinos, o endométrio canino possui capacidade de reconhecer uma grande variedade de ligandos através da activação via TLRs, desencadeando uma resposta imunitária inata contra diversos organismos patogénicos. Tal reconhecimento torna-se de extrema

importância uma vez que o aparelho reprodutor feminino da cadela está sujeito a diversas contaminações durante o coito e também durante as fases do ciclo éstrico em que se verifica uma predominância hormonal de estrogénios, o que leva a um relaxamento e dilatação do cérvix uterino, propiciando infecções ascendentes.

O ambiente uterino é controlado por variações dos níveis de hormonas esteróides (P_4 e E_2) ao longo do ciclo éstrico. Tais variações resultam não só em alterações anatómicas e histológicas mas também em modificações da resposta imunitária. Na cadela, durante o diestro a P_4 para além de estimular a actividade secretora das glândulas endometriais diminui a imunidade local inibindo a capacidade proliferativa dos linfócitos. Por outro lado, na fase folicular o aumento de E_2 promove a migração de células do sistema imunitário para o lúmen uterino (Hardy & Osborne, 1974), aumentando as defesas uterinas.

Estudos efectuados na mulher demonstraram que os TLRs são diferentemente expressos nas diversas partes do aparelho reprodutor, sendo que os TLR2 e 4 apresentam maiores níveis de expressão no endométrio dos cornos uterinos do que no cérvix (Pioli et al., 2004; Fazeli et al., 2005).

Estudos mais recentes relativos à transcrição dos TLRs ao longo do ciclo menstrual revelaram resultados contraditórios. Hirata et al. (2007) demonstraram que a expressão de mRNA dos TLRs 2 a 4 e ainda do TLR9 foi superior na fase peri-menstrual. No entanto, no estudo de Aflatoonian et al. (2007) a expressão de mRNA dos TLR2-6, 9 e 10 foi maior na fase secretora, durante o predomínio da P_4 . Porém, entre estes estudos existem diferenças nas fases do ciclo comparadas e ainda no modo como as mesmas foram confirmadas. Mais recentemente, trabalhos de King & Critchley (2010) permitiram verificar um aumento de expressão do mRNA do TLR4 a meio da fase secretora e ainda que a expressão do mRNA do TLR2 não variou ao longo do ciclo menstrual humano.

De acordo com os nossos resultados verificou-se que é predominantemente no final da fase secretora que a expressão de mRNA tanto do TLR2 como do TLR4 se encontra mais elevada. Verificou-se ainda que durante a fase proliferativa (pró-estro e estro) e no início do diestro esta expressão foi significativamente mais baixa.

Estes dados estão parcialmente de acordo com os resultados obtidos por Aflatoonian et al. (2007) uma vez que na mulher devido provavelmente à curta duração do ciclo menstrual não é comum fazer a divisão da fase secretora em subfases, sendo esta analisada como um grupo único. No entanto, ao contrário de King & Critchley (2010) é no final do diestro, fase em que os níveis de P_4 começam a decrescer, que a expressão de mRNA dos TLRs 2 e 4 foi maior. Tal poderá estar associado ao aumento do número de macrófagos e linfócitos

endometriais característico desta fase. Estes, uma vez activados, expressam os TLRs à sua superfície aumentando assim os níveis de expressão de mRNA analisada no tecido endometrial por PCR em Tempo Real.

A diminuição da transcrição dos TLRs observada durante a primeira metade do diestro, numa altura em que as concentrações de progesterona são maiores, poderá estar implicada na maior susceptibilidade da cadela à piómetra durante esta fase. Tsumagari et al. (2005) demonstraram que existe uma maior susceptibilidade do útero à infecção por *E. coli*, entre os dias 11-20 e ainda 21-30 após o pico de LH o que corresponde ao nosso início de diestro I e II (ID I e II). A diminuição da expressão de mRNA dos TLRs nesta fase poderá resultar no desenvolvimento de uma resposta inflamatória menos efectiva em termos de produção de citocinas.

Outras das razões da maior susceptibilidade à piómetra nesta fase, prende-se com o facto de haver uma diminuição da expressão de mucina-1 (MUC-1), o que está associado a um aumento da adesão da *E. coli* ao endométrio nesta fase. A MUC-1 actua como uma molécula anti-adesão na superfície uterina, dificultando a adesão bacteriana. Embora o gene para a transcrição da MUC-1 seja detectado em todas as fases do ciclo éstrico, a diminuição da expressão do seu mRNA é significativa ao décimo dia do diestro (Ishiguro et al., 2007). Do mesmo modo, Kida et al. (2006) já tinham observado uma diminuição dos níveis de expressão de mRNA da lactoferrina no início do diestro, mais especificamente no 10 dia de diestro. A lactoferrina é, uma molécula com efeito bactericida que, ao diminuir a disponibilidade de ferro, interfere com o metabolismo bacteriano. Deste modo, podemos verificar que o efeito imunossupressor da P_4 é mais acentuado na primeira metade do diestro, numa altura em que as concentrações de progesterona são mais elevadas (Concannon, 1986).

Por outro lado, na cadela, os primeiros 20 dias de diestro correspondem ao período de implantação do embrião (17-21 dias após a fertilização) (Holst & Phemister, 1971; Tsutsui, 1989). Deste modo, a diminuição da imunidade nesta fase possibilita que a implantação ocorra numa fase em que a reacção inflamatória está reduzida, o que de outra forma criaria um meio adverso à implantação e sobrevivência do embrião. Assim a redução da transcrição dos genes dos TLRs pode constituir uma adaptação fisiológica necessária à manutenção inicial da gestação de modo a que não haja rejeição do embrião.

Durante a fase folicular, a baixa transcrição dos TLRs poderá prevenir uma resposta inflamatória exacerbada do endométrio como consequência da contaminação microbiana ascendente que ocorre durante a fase de pró-estro e estro, associada ou não à cópula. No caso de haver cópula, os mediadores químicos, como as prostaglandinas, produzidos durante uma resposta inflamatória exacerbada poderiam perturbar o peristaltismo uterino normal envolvido no transporte do espermatozóide (Hirata et al., 2007).

2. Cultura de Explantes de Endométrio

As prostaglandinas produzidas pelo endométrio são importantes reguladores de diversas funções reprodutivas tais como o controlo da duração do ciclo éstrico em algumas espécies, implantação, manutenção da gestação e indução do parto (Poyser, 1995). A análise das vias que regulam a sua biossíntese tem sido efectuada em cultura de explantes de endométrio e de células epiteliais endometriais (Leung et al., 2001; Luz et al., 2006a; Godkin, Roberts, Elgayyar, Guan & Tithof, 2008; Herath et al., 2009).

Durante a fase folicular, o útero da cadela é frequentemente contaminado por bactérias, resultando muitas vezes no desenvolvimento de piómetra, durante o diestro. A *E. coli* é a bactéria mais frequentemente isolada nos casos de piómetra, estando associada a sinais sistémicos exuberantes. Com menos frequência são isoladas outras bactérias Gram-negativas (*Pasteurella spp*, *Klebsiella spp*) e bactérias Gram positivas (*Streptococcus spp* e *Staphylococcus spp*) (Fransson et al., 1997; Dhaliwal et al., 1998).

De forma a simular a resposta uterina à infecção procedeu-se à estimulação de culturas de explantes de endométrio com LPS e LTA, reproduzindo infecções uterinas por bactérias Gram negativas e positivas.

A capacidade de produção de PGE_2 e de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelos explantes de endométrio de cadela foi consistente com observações semelhantes em bovinos (Herath et al., 2006; Herath et al., 2009), ovinos (Vagnoni, Abbruzzese, Christiansen & Holyoak, 2001) e ainda com um estudo recente em cadelas (Luz et al., 2006a). Após a estimulação dos explantes de endométrio com LPS e LTA verificou-se um aumento na produção de PGE_2 e de $\text{PGF}_{2\alpha}$ o que sugere que a sua capacidade de resposta a estímulos se manteve preservada. Porém, a produção após estimulação com LTA foi, na maioria das vezes, inferior à observada com o LPS. Tal sugere que, para que o LTA seja capaz de suscitar os mesmos efeitos na produção de mediadores inflamatórios observados com estimulação com LPS, seria necessário uma concentração superior àquela utilizada. Zahringer et al., (2008), observaram que as concentrações necessárias para provocar tais reacções são cerca de três a quatro vezes superiores às necessárias de LPS.

Neste trabalho, verificou-se que os explantes de endométrio em final de diestro apresentaram uma produção basal de PGE_2 e de $\text{PGF}_{2\alpha}$ significativamente superior à das restantes fases do ciclo éstrico. Um aumento de produção basal da $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelos explantes de endométrio de fim de diestro em relação aos de anestro, já tinha sido observado por Luz et al., 2006. Estes resultados coincidem com o aumento dos níveis transcrição dos TLRs 2 e

4 observados nesta fase o que, sendo fruto do aumento do número de células de reacção inflamatória ou efectivamente do aumento da expressão de mRNA nas células epiteliais e do estroma endometrial, poderá levar a uma síntese de citocinas pró-inflamatórias e de prostaglandinas mais pronunciada. Tal aumento poderá estar não só envolvido em alterações estruturais e funcionais do endométrio mas também contribuir de algum modo para a completa regressão lútea em final de diestro. Embora não pareça haver diferença nas concentrações plasmáticas de PGFM entre cadelas no final e no início de diestro (Luz, Bertan, Binelli & Lopes, 2006b), concentrações superiores de $\text{PGF}_{2\alpha}$ foram observadas em sangue colhido da veia uterina em comparação com aquele colhido da jugular (Olson, Bowen, Behrendt, Olson & Nett, 1984b). No entanto, a histerectomia em cadelas parece não afectar a duração do ciclo éstrico (Olson, Bowen, Behrendt, Olson & Nett, 1984a; Okkens et al., 1985; Hoffmann, Hoveler, Hasan & Failing, 1992). Na cadela, o processo de luteólise e o envolvimento da $\text{PGF}_{2\alpha}$ de origem uterina no mesmo ainda não está totalmente esclarecido.

A produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e de PGE_2 após a estimulação dos explantes com LPS e com LTA foi significativamente superior no final de diestro, em comparação com as fases de anestro, pró-estro e diestro. Um aumento na produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelos explantes de endométrio de fim de diestro em comparação com os de anestro, após estimulação com um activador da proteína cinase C (PDBu), foi também observado por Luz et al. (2006).

No entanto a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi superior à produção de PGE_2 após estimulação em qualquer das fases estudadas. Na vaca, Herath et al. (2009) observaram um aumento da produção de PGE_2 em relação à $\text{PGF}_{2\alpha}$ após estimulação com LPS de explantes endometriais da fase de diestro. Este facto poderá estar associado com o prolongamento da fase lútea em vacas com infecção uterina. No entanto, cerca de 60% das cadelas com piómetra possuem concentrações de P_4 inferiores a 1ng/mL (Renton, Boyd & Harvey, 1993; Fieni, 2006; England, Freeman & Russo, 2007), numa altura em que esta normalmente estaria na sua concentração máxima. Assim, a luteólise precoce do corpo lúteo observada nos casos de piómetra (principalmente por *E. coli*) pode ser devido ao aumento da produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ associada à infecção uterina. Cadelas com piómetra apresentam concentrações plasmáticas de PGFM maiores que cadelas com hiperplasia quística ou cadelas sem patologia uterina (Hagman et al., 2006). No entanto, não podemos esquecer que as células de reacção inflamatória poderão ter um papel importante no aumento da concentração de PGE_2 no conteúdo intra-uterino. Em bovinos, a estimulação de monócitos e PMNs por LPS induziu um aumento significativo da transcrição de COX2 e PGES que se traduziu por um aumento da concentração de PGE_2 (Silva et al., 2008).

A PGE_2 possui essencialmente um efeito imunossupressor e o seu efeito imunomodulador é observado em linfócitos, monócitos e PMNs, diminuindo a sua capacidade de proliferação (Rocca & FitzGerald, 2002). Por outro lado, pensa-se que esta prostaglandina é importante nos processos inflamatórios, sendo responsável pela vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, assim como na promoção da diapedese dos PMNs (Chizzolini & Brembilla, 2009). Provoca ainda febre, diminuição da motilidade intestinal e parece favorecer a resposta imunitária humoral em detrimento da celular (Bottoms & Adams, 1992). Assim, a produção endometrial de PGE_2 após estímulos como o LPS e o LTA pode ser fundamental no controlo da resposta inflamatória exacerbada, contribuindo para a supressão da imunidade celular em diestro.

Em relação às amostras de endométrio com HQE, não se observaram diferenças na produção de $PGF_{2\alpha}$ e de PGE_2 entre explantes de endométrio com e sem HQE, com excepção de algumas amostras em final de diestro. No entanto, e na medida em que a síntese de prostaglandinas já se encontra aumentada nesta fase, não se conseguiu atribuir este incremento à presença de HQE. Seria necessário restringir as amostras apenas a endométrio em final de diestro e ainda aumentar o número das mesmas, de forma a perceber se realmente este aumento de síntese de $PGF_{2\alpha}$ e PGE_2 seria significativo.

De modo a avaliar se o aumento de $PGF_{2\alpha}$ e de PGE_2 nos meios de cultura dos explantes de endométrio é consequência do aumento de expressão de mRNA das enzimas responsáveis pela sua biossíntese, e ainda dos TLRs 2 e 4, procedeu-se à análise por PCR em Tempo Real dos explantes de quatro cadelas deste estudo.

A transcrição da COX2 em tecido não estimulado às 0 horas demonstrou ser bastante baixa, o que confirma os resultados obtidos neste trabalho por imunohistoquímica. Nestes, a marcação de proteína foi observada apenas em células de reacção inflamatória isoladas e no endotélio de alguns vasos, sendo esta marcação menos acentuada em início de diestro. No endométrio com hiperplasia quística os resultados foram semelhantes o que sugere que esta afecção não altera os níveis de expressão proteica da COX2 no tecido. Resultados idênticos já tinham sido observados por Mateus et al. (2007). Porém, um aumento significativo da expressão da COX2 foi observado no estroma e nas glândulas endometriais, bem como em células de reacção inflamatória, nos casos de piómetra (Mateus et al., 2007; Silva et al., 2010).

No final do período de incubação dos explantes, observou-se um aumento da expressão de mRNA das enzimas PGES e COX2 nos controlos negativos (tecido não estimulado), o que poderá ser resultado da agitação mecânica funcionar como um agente irritante, na medida em que promove agitação do meio e contacto repetido entre o tecido e a placa. Tais

resultados podem reforçar os trabalhos de Nomura (1994) e De Bosschere et al. (2002a), nos quais os referidos autores conseguiram induzir HQE através de biopsias uterinas, escarificação intra-luminal e de substâncias irritantes, como por exemplo fio de sutura de seda. Por outro lado, parece que este estímulo não foi suficiente para alterar a transcrição da PGFS e ainda dos TLRs 2 e 4.

Após a estimulação dos explantes com LPS e LTA observou-se um aumento de expressão de mRNA do gene que codifica a PGES sendo este mais óbvio com estimulação com LPS. Relativamente à COX2 observou-se igualmente um aumento dos seus níveis de transcrição mas apenas com estimulação com LPS. Estes resultados sugerem que a produção de PGE₂ após estímulos como o LPS resulta de uma sincronização de acção entre a PGES e a COX2, como já demonstrado por outros autores (Murakami et al., 2000; Helliwell et al., 2004).

Apesar da produção de PGF_{2α} ter aumentado, não se conseguiu demonstrar neste trabalho o aumento da transcrição da PGFS após estimulação quer com LPS quer com LTA, à semelhança de resultados publicados por outros autores (Herath et al., 2009). Neste estudo, os autores atribuíram o aumento de produção de PGF_{2α} e de PGE₂ ao incremento da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂), a qual é responsável pela libertação do ácido araquidónico (AA) das membranas fosfolipídicas. Também num estudo recentemente publicado não se observaram alterações significativas na transcrição da PGFS entre endométrio de cadelas saudáveis e com piómetra, verificando-se no entanto um aumento significativo da transcrição do gene que codifica a PLA₂ em canídeos (PLA2G7) (Hagman, Ronnberg & Pejler, 2009). Assim, seria interessante analisar igualmente a expressão de mRNA desta enzima em trabalhos futuros, apesar de dois estudos indicarem que em cadelas com piómetra a transcrição da PGFS está aumentada (Silva et al., 2009; Silva et al., 2010).

Embora se tenha detectado a expressão de mRNA dos TLR2 e 4 nos explantes de endométrio, esta não sofreu grandes oscilações durante o período de estimulação, quer com LPS como com LTA, havendo no entanto um aumento na produção de PGE₂ e PGF_{2α}. No entanto, Hagman et al. (2009) e Silva et al. (2010) demonstraram que a transcrição dos TLRs 2 e 4, encontra-se aumentada no endométrio de cadelas com piómetra. Culturas de explantes de placenta humana revelaram resultados semelhantes, não detectando diferenças na expressão de mRNA dos TLRs 2 e 4 após estimulação com LPS, zimosano e outros agonistas. Porém, nestes estudos a estimulação induziu a produção de interleucinas, o que sugere a sua capacidade de resposta a estímulos (Holmlund et al., 2002; Patni et al., 2009). É provável que a transcrição de genes dos TLRs 2 e 4 esteja normalmente aumentada *in utero* como um mecanismo de defesa inato que possa ser rapidamente

mobilizado em caso de infecções ascendentes. Assim, embora se verifique um aumento de produção de prostaglandinas, este poderá não ser acompanhado de aumento da expressão de mRNA destes receptores. Da mesma maneira, as células de reacção inflamatória poderão contribuir para o aumento da transcrição dos TLRs, uma vez que activadas, expressam à sua superfície diversos receptores entre os quais os TLRs (Ozinsky et al., 2000).

A activação dos TLRs 2 e 4 pelos seus agonistas, LPS e LTA, em explantes de endométrio de cadela, poderá resultar na activação de vários factores de transcrição como o NF- κ B, MAPK p38 e JNK levando à produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF α , a IL-1, a IL-6 e ainda o NO (Beutler et al., 2003; Akira et al., 2006). Estas por sua vez vão desencadear uma resposta imunitária que culmina no aumento da transcrição dos genes da síntese de prostaglandinas, levando à produção e acumulação de PGF_{2 α} e de PGE₂ (Helliwell et al., 2004; Mosca et al., 2007).

VII – CONCLUSÕES

O endométrio canino constitui a primeira linha de defesa contra infecções bacterianas ascendentes. Os *toll-like-receptors* (TLRs) são elementos chave no reconhecimento de inúmeros padrões moleculares associados aos agentes patogénicos (PAMPs) por parte do sistema imunitário inato.

Neste estudo detectou-se a expressão de mRNA dos TLRs 1-7 e 9 no endométrio da cadela, o que demonstra a sua capacidade de reconhecimento de uma grande variedade de ligandos através da activação via TLRs, desencadeando uma resposta imunitária inata contra diversos organismos patogénicos.

O ambiente uterino é controlado por variações dos níveis de hormonas esteróides (P_4 e E_2) ao longo do ciclo éstrico. Desta forma, verificou-se uma diminuição dos níveis de transcrição dos TLRs 2 e 4 no início de diestro, entre o dia 0 e o dia 30, altura em que as concentrações plasmáticas de progesterona atingem o seu máximo. Tal pode justificar a maior susceptibilidade do útero à infecção por *E. coli* nesta fase, o que associado à diminuição da expressão de mRNA da mucina-1 e da lactoferrina predispõe ao desenvolvimento de piómetra. Observou-se também um aumento de expressão de mRNA dos TLRs 2 e 4 em final de diestro, o que coincide com um aumento da síntese basal, e após estimulação com LPS e LTA, de PGE_2 e de $PGF_{2\alpha}$ verificado em cultura de explantes. Este aumento pode estar associado ao influxo de células de reacção inflamatória característico desta fase, o que se poderia confirmar através da elaboração de um estudo com culturas puras de células endometriais. O aumento da síntese de $PGF_{2\alpha}$ em final de diestro poderá ainda contribuir para a completa regressão do corpo lúteo.

Pode-se ainda concluir que os explantes de endométrio de cadela possuem uma capacidade de resposta a estímulos pró-inflamatórios, como o LPS e o LTA, como já verificado noutras espécies. Esta estimulação resulta na activação dos TLRs 2 e 4, o que poderá induzir a produção de vários factores de transcrição como o NF- κ B, MAPK p38 e JNK, levando à produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF α , a IL-1, a IL-6 e ainda o NO, que por sua vez levam ao aumento da síntese de PGE_2 e de $PGF_{2\alpha}$.

A estimulação dos explantes, especialmente com LPS, resultou num aumento de expressão de mRNA dos genes que codificam a PGES e a COX2 mas não da PGFS e TLRs 2 e 4. Estes resultados confirmam a associação da acção da PGES à COX2 resultando num aumento da síntese de PGE_2 . É provável que a transcrição de TLRs esteja normalmente aumentada *in utero* como um mecanismo de defesa inato que possa ser rapidamente

mobilizado em caso de infecções ascendentes. Seria ainda necessário investigar o mecanismo subjacente ao aumento da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ após estimulação *in vitro*, nomeadamente a transcrição de genes que codificam a enzima PLA_2 .

VIII - BIBLIOGRAFIA

- Abramovitz, M., Adam, M., Boie, Y., Carriere, M., Denis, D., Godbout, C., Lamontagne, S., Rochette, C., Sawyer, N., Tremblay, N.M., Belley, M., Gallant, M., Dufresne, C., Gareau, Y., Ruel, R., Juteau, H., Labelle, M., Ouimet, N. & Metters, K.M. (2000). "The utilization of recombinant prostanoid receptors to determine the affinities and selectivities of prostaglandins and related analogs." *Biochimica et Biophysica Acta* 1483(2): 285-293.
- Abramovitz, M., Boie, Y., Nguyen, T., Rushmore, T.H., Bayne, M.A., Metters, K.M., Slipetz, D.M. & Grygorczyk, R. (1994). "Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid FP receptor." *Journal of Biological Chemistry* 269(4): 2632-2636.
- Aflatoonian, R. & Fazeli, A. (2008). "Toll-like receptors in female reproductive tract and their menstrual cycle dependent expression." *Journal of Reproductive Immunology* 77(1): 7-13.
- Aflatoonian, R., Tuckerman, E., Elliott, S.L., Bruce, C., Aflatoonian, A., Li, T.C. & Fazeli, A. (2007). "Menstrual cycle-dependent changes of Toll-like receptors in endometrium." *Human Reproduction* 22(2): 586-593.
- Akashi-Takamura, S. & Miyake, K. (2008). "TLR accessory molecules." *Current Opinion in Immunology* 20(4): 420-425.
- Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." *Cell* 124(4): 783-801.
- Appliedbiosystems (2003). Acedido em Out. 10, 2010, disponível em http://www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/quant_pcr.pdf.
- Arosh, J.A., Parent, J., Chapdelaine, P., Sirois, J. & Fortier, M.A. (2002). "Expression of cyclooxygenases 1 and 2 and prostaglandin E synthase in bovine endometrial tissue during the estrous cycle." *Biology of Reproduction* 67(1): 161-169.
- Ashby, B. (1998). "Co-expression of prostaglandin receptors with opposite effects: a model for homeostatic control of autocrine and paracrine signaling." *Biochemical Pharmacology* 55(3): 239-246.
- Asselin, E., Goff, A.K., Bergeron, H. & Fortier, M.A. (1996). "Influence of sex steroids on the production of prostaglandins F2 alpha and E2 and response to oxytocin in cultured epithelial and stromal cells of the bovine endometrium." *Biology of Reproduction* 54(2): 371-379.
- Aughey, E. & Frye, F. (2001). *Introduction Comparative veterinary histology: with clinical correlates* (pp. 9-20). Barcelona: Manson Publishing/Veterinary Press
- Baba, E., Hata, H., Fukata, T. & Arakawa, A. (1983). "Vaginal and uterine microflora of adult dogs." *American Journal of Veterinary Research* 44(4): 606-609.
- Banu, S.K., Lee, J., Speights, V.O., Jr., Starzinski-Powitz, A. & Arosh, J.A. (2009). "Selective inhibition of prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4 induces apoptosis of human endometriotic cells through suppression of ERK1/2, AKT, NFkappaB, and beta-catenin pathways and activation of intrinsic apoptotic mechanisms." *Molecular Endocrinology* 23(8): 1291-1305.

- Beutler, B., Hoebe, K., Du, X. & Ulevitch, R.J. (2003). "How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers." *Journal of Leukocyte Biology* 74(4): 479-485.
- Bhakdi, S., Klonisch, T., Nuber, P. & Fischer, W. (1991). "Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids." *Infection and Immunity* 59(12): 4614-4620.
- Blendinger, K., Bostedt, H. & Hoffmann, B. (1997). "Hormonal state and effects of the use of an antiprogesterin in bitches with pyometra." *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 51: 317-325.
- Borresen, B. (1975). "Pyometra in the dog -- a pathophysiological investigation. I. The pyometra syndrome, a review." *Nordisk Veterinær Medicin* 27(10): 508-517.
- Boschere, H.D., Ducatelle, R., Vermeirsch, H., Broeck, W.V.D. & Coryn, M. (2001). "Cystic endometrial hyperplasia- pyometra complex in the bitch: should the two entities be disconnected?" *Theriogenology* 55(7): 1509-1519.
- Bottoms, G.D. & Adams, H.R. (1992). "Involvement of prostaglandins and leukotrienes in the pathogenesis of endotoxemia and sepsis." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 200(12): 1842-1848.
- Bowie, A.G. (2007). "Translational mini-review series on Toll-like receptors: recent advances in understanding the role of Toll-like receptors in anti-viral immunity." *Clinical and Experimental Immunology* 147(2): 217-226.
- Bukulmez, O., Hardy, D.B., Carr, B.R., Auchus, R.J., Toloubeydokhti, T., Word, R.A. & Mendelson, C.R. (2008). "Androstenedione up-regulation of endometrial aromatase expression via local conversion to estrogen: potential relevance to the pathogenesis of endometriosis." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93(9): 3471-3477.
- Cha, Y.I., Solnica-Krezel, L. & Dubois, R.N. (2006). "Fishing for prostanoids: deciphering the developmental functions of cyclooxygenase-derived prostaglandins." *Developmental Biology* 289(2): 263-272.
- Chen, Y.M., Wright, P.J. & Lee, C.S. (2001). "A model for the study of cystic endometrial hyperplasia in bitches." *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 57: 407-414.
- Chen, Y.M., Wright, P.J., Lee, C.S. & Browning, G.F. (2003). "Uropathogenic virulence factors in isolates of Escherichia coli from clinical cases of canine pyometra and feces of healthy bitches." *Veterinary Microbiology* 94(1): 57-69.
- Chizzolini, C. & Brembilla, N.C. (2009). "Prostaglandin E2: igniting the fire." *Immunology and Cell Biology* 87(7): 510-511.
- Chu, P.Y., Lee, C.S., Moore, P.F. & Wright, P.J. (2001). "Oestrogen and progestagen treated ovariectomized bitches: a model for the study of uterine function." *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 57: 45-54.
- Concannon, P.W. (1986). "Canine pregnancy and parturition." *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 16(3): 453-475.
- Cracowski, J.L., Devillier, P., Durand, T., Stanke-Labesque, F. & Bessard, G. (2001). "Vascular biology of the isoprostanes." *Journal of Vascular Research* 38(2): 93-103.
- Crawford, K. & Kaufman, P.L. (1987). "Pilocarpine antagonizes prostaglandin F2 alpha-induced ocular hypotension in monkeys. Evidence for enhancement of Uveoscleral outflow by prostaglandin F2 alpha." *Archives of Ophthalmology* 105(8): 1112-1116.

- Dannenberg, A.J., Lippman, S.M., Mann, J.R., Subbaramaiah, K. & Dubois, R.N. (2005). "Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor: pharmacologic targets for chemoprevention." *Journal of Clinical Oncology* 23(2): 254-266.
- Davies, D., Meade, K.G., Herath, S., Eckersall, P.D., Gonzalez, D., White, J.O., Conlan, R.S., O'farrelly, C. & Sheldon, I.M. (2008). "Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium." *Reproductive Biology and Endocrinology* 6: 53.
- Davies, P., Bailey, P.J., Goldenberg, M.M. & Ford-Hutchinson, A.W. (1984). "The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation." *Annual Review of Immunology* 2: 335-357.
- De Bosschere, H., Ducatelle, R. & Tshamala, M. (2002). "Is mechanically induced cystic endometrial hyperplasia (CEH) a suitable model for study of spontaneously occurring CEH in the uterus of the bitch?" *Reproduction in Domestic Animals* 37(3): 152-157.
- De Bosschere, H., Ducatelle, R. & Tshamala, M. (2003). "Uterine oestrogen and progesterone receptor expression in experimental pyometra in the bitch." *Journal of Comparative Pathology* 128(2-3): 99-106.
- De Bosschere, H., Ducatelle, R., Vermeirsch, H., Simoens, P. & Coryn, M. (2002). "Estrogen-alpha and progesterone receptor expression in cystic endometrial hyperplasia and pyometra in the bitch." *Animal Reproduction Science* 70(3-4): 251-259.
- De Cock, H., Ducatelle, R., Tilmant, K. & De Schepper, J. (2002). "Possible role for insulin-like growth factor-I in the pathogenesis of cystic endometrial hyperplasia pyometra complex in the bitch." *Theriogenology* 57(9): 2271-2287.
- De Cock, H., Vermeirsch, H., Ducatelle, R. & De Schepper, J. (1997). "Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in cystic-endometritis-pyometra complex in the bitch." *Theriogenology* 48(6): 1035-1047.
- De Schepper, J., Van Der Stock, J. & Capiiau, E. (1987). "The characteristic pattern of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase in the bitch with the cystic hyperplasia-pyometra complex: effect of medical or surgical treatment." *Veterinary Research Communications* 11(1): 65-75.
- Dhaliwal, G.K., Wray, C. & Noakes, D.E. (1998). "Uterine bacterial flora and uterine lesions in bitches with cystic endometrial hyperplasia (pyometra)." *Veterinary Record* 143(24): 659-661.
- Dow, C. (1959a). "The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch." *Journal of Comparative Pathology* 69: 237-250.
- Dow, C. (1959b). "Experimental reproduction of the cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch." *Journal of Pathology and Bacteriology* 78: 267-278.
- Doyle, S.L. & O'Neill, L.A. (2006). "Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity." *Biochemical Pharmacology* 72(9): 1102-1113.
- Egenvall, A., Hagman, R., Bonnett, B.N., Hedhammar, A., Olson, P. & Lagerstedt, A.S. (2001). "Breed risk of pyometra in insured dogs in Sweden." *Journal of Veterinary Internal Medicine* 15(6): 530-538.

- Eisinger, A.L., Prescott, S.M., Jones, D.A. & Stafforini, D.M. (2007). "The role of cyclooxygenase-2 and prostaglandins in colon cancer." *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 82(1-4): 147-154.
- England, G.C., Freeman, S.L. & Russo, M. (2007). "Treatment of spontaneous pyometra in 22 bitches with a combination of cabergoline and cloprostenol." *Veterinary Record* 160(9): 293-296.
- Euler, U.S.V. (1935). "Ober die spezifische blutdrucksenkende substanz des menschlichen Prostata- und Samenblasensekretes." *Klinische Wochenschrift* 33: 1182-1183.
- Fazeli, A., Bruce, C. & Anumba, D.O. (2005). "Characterization of Toll-like receptors in the female reproductive tract in humans." *Human Reproduction* 20(5): 1372-1378.
- Fieni, F. (2006). "Clinical evaluation of the use of aglepristone, with or without cloprostenol, to treat cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in bitches." *Theriogenology* 66(6-7): 1550-1556.
- Fischer, W. (1988). "Physiology of lipoteichoic acids in bacteria." *Advances in Microbial Physiology* 29: 233-302.
- Fransson, B., Lagerstedt, A.S., Hellmen, E. & Jonsson, P. (1997). "Bacteriological findings, blood chemistry profile and plasma endotoxin levels in bitches with pyometra or other uterine diseases." *Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe A* 44(7): 417-426.
- Fredriksson, G. (1984). "Some reproductive and clinical aspects of endotoxins in cows with special emphasis on the role of prostaglandins." *Acta Veterinaria Scandinavica* 25(3): 365-377.
- Fujino, H., Srinivasan, D. & Regan, J.W. (2002). "Cellular conditioning and activation of beta-catenin signaling by the FPB prostanoid receptor." *Journal of Biological Chemistry* 277(50): 48786-48795.
- Gantner, B.N., Simmons, R.M., Canavera, S.J., Akira, S. & Underhill, D.M. (2003). "Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2." *Journal of Experimental Medicine* 197(9): 1107-1117.
- Gao, J.J., Xue, Q., Zuvanich, E.G., Haghi, K.R. & Morrison, D.C. (2001). "Commercial preparations of lipoteichoic acid contain endotoxin that contributes to activation of mouse macrophages in vitro." *Infection and Immunity* 69(2): 751-757.
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R. & Mathieu, C. (2001). "An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression." *Methods* 25(4): 386-401.
- Godkin, J.D., Roberts, M.P., Elgayyar, M., Guan, W. & Tithof, P.K. (2008). "Phospholipase A2 regulation of bovine endometrial (BEND) cell prostaglandin production." *Reproductive Biology and Endocrinology* 6: 44.
- Goodwin, J.K. & Schaer, M. (1989). "Septic shock." *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 19(6): 1239-1258.
- Granstrom, E. & Kindahl, H. (1982). "Radioimmunoassay of the major plasma metabolite of PGF2 alpha, 15-keto-13,14-dihydro-PGF2 alpha." *Methods in Enzymology* 86: 320-339.
- Guan, Y., Zhang, Y., Schneider, A., Riendeau, D., Mancini, J.A., Davis, L., Komhoff, M., Breyer, R.M. & Breyer, M.D. (2001). "Urogenital distribution of a mouse membrane-

- associated prostaglandin E(2) synthase." *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 281(6): F1173-1177.
- Hagman, R. (2004). *New Aspects of Canine Pyometra - Studies on epidemiology and pathogenesis*. Ph.D. thesis. Uppsala, Sweden: Department of Small Animal Clinical Sciences, The Swedish University of Agricultural Sciences.
- Hagman, R., Kindahl, H., Fransson, B.A., Bergstrom, A., Holst, B.S. & Lagerstedt, A.S. (2006a). "Differentiation between pyometra and cystic endometrial hyperplasia/mucometra in bitches by prostaglandin F2alpha metabolite analysis." *Theriogenology* 66(2): 198-206.
- Hagman, R., Kindahl, H. & Lagerstedt, A.S. (2006b). "Pyometra in bitches induces elevated plasma endotoxin and prostaglandin F2alpha metabolite levels." *Acta Veterinaria Scandinavica* 47: 55-67.
- Hagman, R., Ronnberg, E. & Pejler, G. (2009). "Canine uterine bacterial infection induces upregulation of proteolysis-related genes and downregulation of homeobox and zinc finger factors." *PLoS ONE* 4(11): e8039.
- Hardy, R.M. & Osborne, C.A. (1974). "Canine pyometra: pathogenesis, physiology, diagnosis and treatment of uterine and extra-uterine lesions." *Journal of the American Animal Hospital Association* 10: 245-268.
- Hata, A.N. & Breyer, R.M. (2004). "Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation." *Pharmacology and Therapeutics* 103(2): 147-166.
- Heap, R.B. (1975). "Prostaglandins in pyometrial fluid from the cow, bitch and ferret." *British Journal of Pharmacology* 55(4): 515-518.
- Heine, H. & Lien, E. (2003). "Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity." *International Archives of Allergy and Immunology* 130(3): 180-192.
- Helliwell, R.J., Adams, L.F. & Mitchell, M.D. (2004). "Prostaglandin synthases: recent developments and a novel hypothesis." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 70(2): 101-113.
- Hellman, J., Tehan, M.M. & Warren, H.S. (2003). "Murein lipoprotein, peptidoglycan-associated lipoprotein, and outer membrane protein A are present in purified rough and smooth lipopolysaccharides." *Journal of Infectious Diseases* 188(2): 286-289.
- Herath, S., Fischer, D.P., Werling, D., Williams, E.J., Lilly, S.T., Dobson, H., Bryant, C.E. & Sheldon, I.M. (2006). "Expression and function of Toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus." *Endocrinology* 147(1): 562-570.
- Herath, S., Lilly, S.T., Fischer, D.P., Williams, E.J., Dobson, H., Bryant, C.E. & Sheldon, I.M. (2009). "Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F2alpha to prostaglandin E2 in bovine endometrium." *Endocrinology* 150(4): 1912-1920.
- Hirata, T., Osuga, Y., Hamasaki, K., Hirota, Y., Nose, E., Morimoto, C., Harada, M., Takemura, Y., Koga, K., Yoshino, O., Tajima, T., Hasegawa, A., Yano, T. & Taketani, Y. (2007). "Expression of toll-like receptors 2, 3, 4, and 9 genes in the human endometrium during the menstrual cycle." *Journal of Reproductive Immunology* 74(1-2): 53-60.

- Hizaki, H., Segi, E., Sugimoto, Y., Hirose, M., Saji, T., Ushikubi, F., Matsuoka, T., Noda, Y., Tanaka, T., Yoshida, N., Narumiya, S. & Ichikawa, A. (1999). "Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP(2)." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(18): 10501-10506.
- Hoebe, K., Georgel, P., Rutschmann, S., Du, X., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Shamel, L., Hartung, T., Zahringer, U. & Beutler, B. (2005). "CD36 is a sensor of diacylglycerides." *Nature* 433(7025): 523-527.
- Hoffmann, B., Hoveler, R., Hasan, S.H. & Failing, K. (1992). "Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy." *Journal of Reproduction and Fertility* 96(2): 837-845.
- Holmlund, U., Cebers, G., Dahlfors, A.R., Sandstedt, B., Bremme, K., Ekstrom, E.S. & Scheynius, A. (2002). "Expression and regulation of the pattern recognition receptors Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in the human placenta." *Immunology* 107(1): 145-151.
- Holst, P.A. & Phemister, R.D. (1971). "The prenatal development of the dog: preimplantation events." *Biology of Reproduction* 5(2): 194-206.
- Horne, A.W., Stock, S.J. & King, A.E. (2008). "Innate immunity and disorders of the female reproductive tract." *Reproduction* 135(6): 739-749.
- Ishiguro, K., Baba, E., Torii, R., Tamada, H., Kawate, N., Hatoya, S., Wijewardana, V., Kumagai, D., Sugiura, K., Sawada, T. & Inaba, T. (2007). "Reduction of mucin-1 gene expression associated with increased Escherichia coli adherence in the canine uterus in the early stage of dioestrus." *Veterinary Journal* 173(2): 325-332.
- Jabbour, H.N. & Sales, K.J. (2004). "Prostaglandin receptor signalling and function in human endometrial pathology." *Trends in Endocrinology and Metabolism* 15(8): 398-404.
- Jakobsson, P.J., Thoren, S., Morgenstern, R. & Samuelsson, B. (1999). "Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(13): 7220-7225.
- Janeway, C.A., Jr. & Medzhitov, R. (2002). "Innate immune recognition." *Annual Review of Immunology* 20: 197-216.
- Kawai, T. & Akira, S. (2006). "TLR signaling." *Cell Death and Differentiation* 13(5): 816-825.
- Kawai, T. & Akira, S. (2010). "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors." *Nature Immunology* 11(5): 373-384.
- Keller, R., Fischer, W., Keist, R. & Bassetti, S. (1992). "Macrophage response to bacteria: induction of marked secretory and cellular activities by lipoteichoic acids." *Infection and Immunity* 60(9): 3664-3672.
- Kennedy, C.R., Zhang, Y., Brandon, S., Guan, Y., Coffee, K., Funk, C.D., Magnuson, M.A., Oates, J.A., Breyer, M.D. & Breyer, R.M. (1999). "Salt-sensitive hypertension and reduced fertility in mice lacking the prostaglandin EP2 receptor." *Nature Medicine* 5(2): 217-220.
- Khan, K.N., Kitajima, M., Hiraki, K., Fujishita, A., Sekine, I., Ishimaru, T. & Masuzaki, H. (2009). "Toll-like receptors in innate immunity: role of bacterial endotoxin and toll-like

- receptor 4 in endometrium and endometriosis." *Gynecologic and Obstetric Investigation* 68(1): 40-52.
- Kida, K., Baba, E., Torii, R., Kawate, N., Hatoya, S., Wijewardana, V., Sugiura, K., Sawada, T., Tamada, H. & Inaba, T. (2006). "Lactoferrin expression in the canine uterus during the estrous cycle and with pyometra." *Theriogenology* 66(5): 1325-1333.
- Kida, K., Maezono, Y., Kawate, N., Inaba, T., Hatoya, S. & Tamada, H. (2010). "Epidermal growth factor, transforming growth factor- α , and epidermal growth factor receptor expression and localization in the canine endometrium during the estrous cycle and in bitches with pyometra." *Theriogenology* 73(1): 36-47.
- Kim, H.M., Park, B.S., Kim, J.I., Kim, S.E., Lee, J., Oh, S.C., Enkhbayar, P., Matsushima, N., Lee, H., Yoo, O.J. & Lee, J.O. (2007). "Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran." *Cell* 130(5): 906-917.
- King, A.E. & Critchley, H.O. (2010). "Oestrogen and progesterone regulation of inflammatory processes in the human endometrium." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 120(2-3): 116-126.
- Kirschning, C.J., Wesche, H., Merrill Ayres, T. & Rothe, M. (1998). "Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide." *Journal of Experimental Medicine* 188(11): 2091-2097.
- Kustritz, M.V.R. (2007). "Determining the optimal age for gonadectomy of dogs and cats." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 231(11): 1665-1675.
- Lazarus, M., Kubata, B.K., Eguchi, N., Fujitani, Y., Urade, Y. & Hayaishi, O. (2002). "Biochemical characterization of mouse microsomal prostaglandin E synthase-1 and its colocalization with cyclooxygenase-2 in peritoneal macrophages." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 397(2): 336-341.
- Lee, H.K., Lee, J. & Tobias, P.S. (2002). "Two lipoproteins extracted from *Escherichia coli* K-12 LCD25 lipopolysaccharide are the major components responsible for Toll-like receptor 2-mediated signaling." *Journal of Immunology* 168(8): 4012-4017.
- Leitner, M., Aurich, J.E., Galabova, G., Aurich, C. & Walter, I. (2003). "Lectin binding patterns in normal canine endometrium and in bitches with pyometra and cystic endometrial hyperplasia." *Histology and Histopathology* 18(3): 787-795.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M. & Hoffmann, J.A. (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." *Cell* 86(6): 973-983.
- Leung, S.T., Cheng, Z., Sheldrick, E.L., Derecka, K., Flint, A.P. & Wathes, D.C. (2001). "The effects of lipopolysaccharide and interleukins-1 α , -2 and -6 on oxytocin receptor expression and prostaglandin production in bovine endometrium." *Journal of Endocrinology* 168(3): 497-508.
- Luz, M.R., Bertan, C.M., Binelli, M. & Lopes, M.D. (2006a). "In vitro PGF2 α production by endometrium and corpus luteum explants from pregnant and nonpregnant diestrus bitches and placental explants from pregnant bitches." *Theriogenology* 66(6-7): 1442-1447.
- Luz, M.R., Bertan, C.M., Binelli, M. & Lopes, M.D. (2006b). "Plasma concentrations of 13,14-dihydro-15-keto prostaglandin F2- α (PGFM), progesterone and estradiol in

- pregnant and nonpregnant diestrus cross-bred bitches." *Theriogenology* 66(6-7): 1436-1441.
- Mancini, J.A., Blood, K., Guay, J., Gordon, R., Claveau, D., Chan, C.C. & Riendeau, D. (2001). "Cloning, expression, and up-regulation of inducible rat prostaglandin synthase during lipopolysaccharide-induced pyresis and adjuvant-induced arthritis." *Journal of Biological Chemistry* 276(6): 4469-4475.
- Mateus, L., Kowalewski, M.P., Leitão, S., Silva, R., Cavaco, L., Lopes Da Costa, L. & Hoffmann, B. (2007). "Relationship between COX-2 expression in the uteri with the histological and clinical findings in bitches with or without CEH-pyometra." 16^o Congresso Nacional APMVEAC, 5th Annual Symposium of EVSSAR: 1 a 3 Junho, Estoril, Portugal, pp 123.
- Mccoy, C.E. & O'Neill, L.A. (2008). "The role of toll-like receptors in macrophages." *Frontiers in Bioscience* 13: 62-70.
- Mccracken, J.A., Custer, E.E. & Lamsa, J.C. (1999). "Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event." *Physiological Reviews* 79(2): 263-323.
- Means, T.K., Lien, E., Yoshimura, A., Wang, S., Golenbock, D.T. & Fenton, M.J. (1999a). "The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors." *Journal of Immunology* 163(12): 6748-6755.
- Means, T.K., Wang, S., Lien, E., Yoshimura, A., Golenbock, D.T. & Fenton, M.J. (1999b). "Human toll-like receptors mediate cellular activation by Mycobacterium tuberculosis." *Journal of Immunology* 163(7): 3920-3927.
- Mezzetti, A., Cipollone, F. & Cuccurullo, F. (2000). "Oxidative stress and cardiovascular complications in diabetes: isoprostanes as new markers on an old paradigm." *Cardiovascular Research* 47(3): 475-488.
- Morath, S., Geyer, A., Spreitzer, I., Hermann, C. & Hartung, T. (2002). "Structural decomposition and heterogeneity of commercial lipoteichoic Acid preparations." *Infection and Immunity* 70(2): 938-944.
- Moriuchi, H., Koda, N., Okuda-Ashitaka, E., Daiyasu, H., Ogasawara, K., Toh, H., Ito, S., Woodward, D.F. & Watanabe, K. (2008). "Molecular characterization of a novel type of prostamide/prostaglandin F synthase, belonging to the thioredoxin-like superfamily." *Journal of Biological Chemistry* 283(2): 792-801.
- Mosca, M., Polentarutti, N., Mangano, G., Apicella, C., Doni, A., Mancini, F., De Bortoli, M., Coletta, I., Polenzani, L., Santoni, G., Sironi, M., Vecchi, A. & Mantovani, A. (2007). "Regulation of the microsomal prostaglandin E synthase-1 in polarized mononuclear phagocytes and its constitutive expression in neutrophils." *Journal of Leukocyte Biology* 82(2): 320-326.
- Murakami, M., Nakashima, K., Kamei, D., Masuda, S., Ishikawa, Y., Ishii, T., Ohmiya, Y., Watanabe, K. & Kudo, I. (2003). "Cellular prostaglandin E2 production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2." *Journal of Biological Chemistry* 278(39): 37937-37947.
- Murakami, M., Naraba, H., Tanioka, T., Semmyo, N., Nakatani, Y., Kojima, F., Ikeda, T., Fueki, M., Ueno, A., Oh, S. & Kudo, I. (2000). "Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2." *Journal of Biological Chemistry* 275(42): 32783-32792.

- Narumiya, S. & Fitzgerald, G.A. (2001). "Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function." *Journal of Clinical Investigation* 108(1): 25-30.
- Narumiya, S., Sugimoto, Y. & Ushikubi, F. (1999). "Prostanoid receptors: structures, properties, and functions." *Physiological Reviews* 79(4): 1193-1226.
- Niskanen, M. & Thrusfield, M.V. (1998). "Associations between age, parity, hormonal therapy and breed, and pyometra in Finnish dogs." *Veterinary Record* 143(18): 493-498.
- Noakes, D.E., Dhaliwal, G.K. & England, G.C. (2001). "Cystic endometrial hyperplasia/pyometra in dogs: a review of the causes and pathogenesis." *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* 57: 395-406.
- Nomura, K. (1994). "Induction of a deciduoma in the dog." *Journal of Veterinary Medical Science* 56(2): 365-369.
- Okano, S., Tagawa, M. & Takase, K. (1998). "Relationship of the blood endotoxin concentration and prognosis in dogs with pyometra." *Journal of Veterinary Medical Science* 60(11): 1265-1267.
- Okkens, A.C., Dieleman, S.J., Bevers, M.M. & Willemse, A.H. (1985). "Evidence for the non-involvement of the uterus in the lifespan of the corpus luteum in the cyclic dog." *Veterinary Quarterly* 7(3): 169-173.
- Olson, P.N., Bowen, R.A., Behrendt, M.D., Olson, J.D. & Nett, T.M. (1984a). "Concentrations of progesterone and luteinizing hormone in the serum of diestrous bitches before and after hysterectomy." *American Journal of Veterinary Research* 45(1): 149-153.
- Olson, P.N., Bowen, R.A., Behrendt, M.D., Olson, J.D. & Nett, T.M. (1984b). "Validation of radioimmunoassays to measure prostaglandins F2 alpha and E2 in canine endometrium and plasma." *American Journal of Veterinary Research* 45(1): 119-124.
- Onclin, K., Murphy, B. & Verstegen, J.P. (2002). "Comparisons of estradiol, LH and FSH patterns in pregnant and nonpregnant beagle bitches." *Theriogenology* 57(8): 1957-1972.
- Ozinsky, A., Underhill, D.M., Fontenot, J.D., Hajjar, A.M., Smith, K.D., Wilson, C.B., Schroeder, L. & Aderem, A. (2000). "The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(25): 13766-13771.
- Parent, J. & Fortier, M.A. (2005). "Expression and contribution of three different isoforms of prostaglandin E synthase in the bovine endometrium." *Biology of Reproduction* 73(1): 36-44.
- Parker, L.C., Prince, L.R. & Sabroe, I. (2007). "Translational mini-review series on Toll-like receptors: networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity." *Clinical and Experimental Immunology* 147(2): 199-207.
- Patni, S., Wynen, L.P., Seager, A.L., Morgan, G., White, J.O. & Thornton, C.A. (2009). "Expression and activity of Toll-like receptors 1-9 in the human term placenta and changes associated with labor at term." *Biology of Reproduction* 80(2): 243-248.
- Payan Carreira, R. & Pires, M.A. (2005). "Hiperplasia quística do endométrio em cadelas " *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 100: 5-16.

- Pierce, K.L., Bailey, T.J., Hoyer, P.B., Gil, D.W., Woodward, D.F. & Regan, J.W. (1997). "Cloning of a carboxyl-terminal isoform of the prostanoid FP receptor." *Journal of Biological Chemistry* 272(2): 883-887.
- Pioli, P.A., Amiel, E., Schaefer, T.M., Connolly, J.E., Wira, C.R. & Guyre, P.M. (2004). "Differential expression of Toll-like receptors 2 and 4 in tissues of the human female reproductive tract." *Infection and Immunity* 72(10): 5799-5806.
- Poyser, N.L. (1995). "The control of prostaglandin production by the endometrium in relation to luteolysis and menstruation." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 53(3): 147-195.
- Reingold, D.F., Kawasaki, A. & Needleman, P. (1981). "A novel prostaglandin 11-keto reductase found in rabbit liver." *Biochimica et Biophysica Acta* 659(1): 179-188.
- Renton, J.P., Boyd, J.S. & Harvey, M.J. (1993). "Observations on the treatment and diagnosis of open pyometra in the bitch (*Canis familiaris*)." *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* 47: 465-469.
- Rocca, B. & Fitzgerald, G.A. (2002). "Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response." *International Immunopharmacology* 2(5): 603-630.
- Rowley, A.F., Vogan, C.L., Taylor, G.W. & Clare, A.S. (2005). "Prostaglandins in non-insectan invertebrates: recent insights and unsolved problems." *Journal of Experimental Biology* 208(Pt 1): 3-14.
- Sales, K.J. & Jabbour, H.N. (2003a). "Cyclooxygenase enzymes and prostaglandins in pathology of the endometrium." *Reproduction* 126(5): 559-567.
- Sales, K.J. & Jabbour, H.N. (2003b). "Cyclooxygenase enzymes and prostaglandins in reproductive tract physiology and pathology." *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 71(3-4): 97-117.
- Samuelsson, B., Goldyne, M., Granstrom, E., Hamberg, M., Hammarstrom, S. & Malmsten, C. (1978). "Prostaglandins and thromboxanes." *Annual Review of Biochemistry* 47: 997-1029.
- Schaefer, T.M., Desouza, K., Fahey, J.V., Beagley, K.W. & Wira, C.R. (2004). "Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated cytokine/chemokine production by human uterine epithelial cells." *Immunology* 112(3): 428-436.
- Schaefer, T.M., Fahey, J.V., Wright, J.A. & Wira, C.R. (2005). "Innate immunity in the human female reproductive tract: antiviral response of uterine epithelial cells to the TLR3 agonist poly(I:C)." *Journal of Immunology* 174(2): 992-1002.
- Schlafer, D.H. & Gifford, A.T. (2008). "Cystic endometrial hyperplasia, pseudo-placentational endometrial hyperplasia, and other cystic conditions of the canine and feline uterus." *Theriogenology* 70(3): 349-358.
- Schroder, N.W., Morath, S., Alexander, C., Hamann, L., Hartung, T., Zahringer, U., Gobel, U.B., Weber, J.R. & Schumann, R.R. (2003). "Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved." *Journal of Biological Chemistry* 278(18): 15587-15594.

- Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M. & Kirschning, C.J. (1999). "Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2." *Journal of Biological Chemistry* 274(25): 17406-17409.
- Serhan, C.N. & Levy, B. (2003). "Success of prostaglandin E2 in structure-function is a challenge for structure-based therapeutics." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(15): 8609-8611.
- Silva, E., Gaivao, M., Leitao, S., Amaro, A., Costa, L.L. & Mateus, L. (2008). "Blood COX-2 and PGES gene transcription during the peripartum period of dairy cows with normal puerperium or with uterine infection." *Domestic Animal Endocrinology* 35(3): 314-323.
- Silva, E., Leitao, S., Ferreira-Dias, G., Lopes Da Costa, L. & Mateus, L. (2009). "Prostaglandin synthesis genes are differentially transcribed in normal and pyometra endometria of bitches." *Reproduction in Domestic Animals* 44 Suppl 2: 200-203.
- Silva, E., Leitao, S., Henriques, S., Kowalewski, M.P., Hoffmann, B., Ferreira-Dias, G., Da Costa, L.L. & Mateus, L. (2010). "Gene transcription of TLR2, TLR4, LPS ligands and prostaglandin synthesis enzymes are up-regulated in canine uteri with cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex." *Journal of Reproductive Immunology* 84(1): 66-74.
- Smith, F.O. (2006). "Canine pyometra." *Theriogenology* 66(3): 610-612.
- Smith, W.L. (1989). "The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action." *Biochemical Journal* 259(2): 315-324.
- Soper, D.L., Milbank, J.B., Mieling, G.E., Dirr, M.J., Kende, A.S., Cooper, R., Jee, W.S., Yao, W., Chen, J.L., Bodman, M., Lundy, M.W., De, B., Stella, M.E., Ebetino, F.H., Wang, Y., Delong, M.A. & Wos, J.A. (2001). "Synthesis and biological evaluation of prostaglandin-F alkylphosphinic acid derivatives as bone anabolic agents for the treatment of osteoporosis." *Journal of Medicinal Chemistry* 44(24): 4157-4169.
- Stichtenoth, D.O., Thoren, S., Bian, H., Peters-Golden, M., Jakobsson, P.J. & Crofford, L.J. (2001). "Microsomal prostaglandin E synthase is regulated by proinflammatory cytokines and glucocorticoids in primary rheumatoid synovial cells." *Journal of Immunology* 167(1): 469-474.
- Sugimoto, Y., Narumiya, S. & Ichikawa, A. (2000). "Distribution and function of prostanoid receptors: studies from knockout mice." *Progress in Lipid Research* 39(4): 289-314.
- Sugimoto, Y., Negishi, M., Hayashi, Y., Namba, T., Honda, A., Watabe, A., Hirata, M., Narumiya, S. & Ichikawa, A. (1993). "Two isoforms of the EP3 receptor with different carboxyl-terminal domains. Identical ligand binding properties and different coupling properties with Gi proteins." *Journal of Biological Chemistry* 268(4): 2712-2718.
- Sugimoto, Y., Segi, E., Tsuboi, K., Ichikawa, A. & Narumiya, S. (1998). "Female reproduction in mice lacking the prostaglandin F receptor. Roles of prostaglandin and oxytocin receptors in parturition." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 449: 317-321.
- Sugiura, K., Nishikawa, M., Ishiguro, K., Tajima, T., Inaba, M., Torii, R., Hatoya, S., Wijewardana, V., Kumagai, D., Tamada, H., Sawada, T., Ikehara, S. & Inaba, T. (2004). "Effect of ovarian hormones on periodical changes in immune resistance associated with estrous cycle in the beagle bitch." *Immunobiology* 209(8): 619-627.

- Suzuki, T., Fujii, Y., Miyano, M., Chen, L.Y., Takahashi, T. & Watanabe, K. (1999). "cDNA cloning, expression, and mutagenesis study of liver-type prostaglandin F synthase." *Journal of Biological Chemistry* 274(1): 241-248.
- Takayama, K., Garcia-Cardena, G., Sukhova, G.K., Comander, J., Gimbrone, M.A., Jr. & Libby, P. (2002). "Prostaglandin E2 suppresses chemokine production in human macrophages through the EP4 receptor." *Journal of Biological Chemistry* 277(46): 44147-44154.
- Takeuchi, O., Hoshino, K. & Akira, S. (2000). "Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection." *Journal of Immunology* 165(10): 5392-5396.
- Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R.L. & Akira, S. (2002). "Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins." *Journal of Immunology* 169(1): 10-14.
- Tamada, H., Tominaga, M., Kida, K., Kawate, N., Inaba, T., Matsuyama, S. & Sawada, T. (2005). "Detection of transforming growth factor- α and epidermal growth factor receptor mRNA and immunohistochemical localization of the corresponding proteins in the canine uterus during the estrous cycle." *Histology and Histopathology* 20(3): 817-824.
- Tanikawa, N., Ohmiya, Y., Ohkubo, H., Hashimoto, K., Kangawa, K., Kojima, M., Ito, S. & Watanabe, K. (2002). "Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 291(4): 884-889.
- Tanioka, T., Nakatani, Y., Semmyo, N., Murakami, M. & Kudo, I. (2000). "Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis." *Journal of Biological Chemistry* 275(42): 32775-32782.
- Tilley, S.L., Audoly, L.P., Hicks, E.H., Kim, H.S., Flannery, P.J., Coffman, T.M. & Koller, B.H. (1999). "Reproductive failure and reduced blood pressure in mice lacking the EP2 prostaglandin E2 receptor." *Journal of Clinical Investigation* 103(11): 1539-1545.
- Triantafyllou, M., Gamper, F.G., Haston, R.M., Mouratis, M.A., Morath, S., Hartung, T. & Triantafyllou, K. (2006). "Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting." *Journal of Biological Chemistry* 281(41): 31002-31011.
- Tsumagari, S., Ishinazaka, T., Kamata, H., Ohba, S., Tanaka, S., Ishii, M. & Memon, M.A. (2005). "Induction of canine pyometra by inoculation of *Escherichia coli* into the uterus and its relationship to reproductive features." *Animal Reproduction Science* 87(3-4): 301-308.
- Tsutsui, T. (1989). "Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs." *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* 39: 269-275.
- Underhill, D.M., Ozinsky, A., Hajjar, A.M., Stevens, A., Wilson, C.B., Bassetti, M. & Aderem, A. (1999). "The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens." *Nature* 401(6755): 811-815.
- Vagnoni, K.E., Abbruzzese, S.B., Christiansen, N.D. & Holyoak, G.R. (2001). "The influence of the phase of the estrous cycle on sheep endometrial tissue response to lipopolysaccharide." *Journal of Animal Science* 79(2): 463-469.

- Van Rees, B.P., Sivula, A., Thoren, S., Yokozaki, H., Jakobsson, P.J., Offerhaus, G.J. & Ristimäki, A. (2003). "Expression of microsomal prostaglandin E synthase-1 in intestinal type gastric adenocarcinoma and in gastric cancer cell lines." *International Journal of Cancer* 107(4): 551-556.
- Wang, D. & Dubois, R.N. (2006). "Prostaglandins and cancer." *Gut* 55(1): 115-122.
- Watanabe, K. (2002). "Prostaglandin F synthase." *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 68-69: 401-407.
- Watanabe, K., Iguchi, Y., Iguchi, S., Arai, Y., Hayaishi, O. & Roberts, L.J., 2nd (1986). "Stereospecific conversion of prostaglandin D2 to (5Z,13E)-(15S)-9 alpha-11 beta,15-trihydroxyprosta-5,13-dien-1-oic acid (9 alpha,11 beta-prostaglandin F2) and of prostaglandin H2 to prostaglandin F2 alpha by bovine lung prostaglandin F synthase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(6): 1583-1587.
- Watts, J.R., Wright, P.J. & Whithear, K.C. (1996). "Uterine, cervical and vaginal microflora of the normal bitch throughout the reproductive cycle." *Journal of Small Animal Practice* 37(2): 54-60.
- Weber, P.C. (1980). "Renal prostaglandins, kidney function and essential hypertension." *Contributions to Nephrology* 23: 83-92.
- Werts, C., Girardin, S.E. & Philpott, D.J. (2006). "TIR, CARD and PYRIN: three domains for an antimicrobial triad." *Cell Death and Differentiation* 13(5): 798-815.
- Werts, C., Tapping, R.I., Mathison, J.C., Chuang, T.H., Kravchenko, V., Saint Girons, I., Haake, D.A., Godowski, P.J., Hayashi, F., Ozinsky, A., Underhill, D.M., Kirschning, C.J., Wagner, H., Aderem, A., Tobias, P.S. & Ulevitch, R.J. (2001). "Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism." *Nature Immunology* 2(4): 346-352.
- Wira, C.R., Fahey, J.V., Sentman, C.L., Pioli, P.A. & Shen, L. (2005). "Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions." *Immunological Reviews* 206: 306-335.
- Yang, R.B., Mark, M.R., Gray, A., Huang, A., Xie, M.H., Zhang, M., Goddard, A., Wood, W.I., Gurney, A.L. & Godowski, P.J. (1998). "Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling." *Nature* 395(6699): 284-288.
- Yoshimura, A., Lien, E., Ingalls, R.R., Tuomanen, E., Dziarski, R. & Golenbock, D. (1999). "Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2." *Journal of Immunology* 163(1): 1-5.
- Zahringer, U., Lindner, B., Inamura, S., Heine, H. & Alexander, C. (2008). "TLR2 - promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity." *Immunobiology* 213(3-4): 205-224.